

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**Estudio del mecanismo de translocación núcleo-citoplasma
de la glucokinasa mediante la caracterización funcional de
mutaciones asociadas a hiperglucemia familiar MODY2**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ángel Gutiérrez Nogués

DIRECTORA

María Ángeles Navas Hernández

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**Estudio del mecanismo de translocación núcleo-citoplasma de
la glucokinasa mediante la caracterización funcional de
mutaciones asociadas a hiperglucemia familiar MODY2.**

MEMORIA PRESENTADA POR:

ÁNGEL GUTIÉRREZ NOGUÉS

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
DOCTORA:

M^a ÁNGELES NAVAS HERNÁNDEZ

Madrid, 2017



Dña. M^a ÁNGELES NAVAS HERNÁNDEZ, PROFESORA TITULAR del DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR de la FACULTAD DE MEDICINA de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que el licenciado **Ángel Gutiérrez Nogués** ha realizado el trabajo titulado: **“ESTUDIO DEL MECANISMO DE TRANSLOCACIÓN NÚCLEO-CITOPLASMA DE LA GLUCOKINASA MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES ASOCIADAS A HIPERGLUCEMIA FAMILIAR MODY2”**, bajo mi dirección en el DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR de la FACULTAD DE MEDICINA de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID para optar al grado de Doctor.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Madrid, a 09 de enero de 2017.

VºBº del Director

Fdo.: M^a Ángeles Navas Hernández

AGRADECIMIENTOS

¡Al fin! Aquí está el resultado de la labor que hemos llevado a cabo durante estos cinco años. Y digo bien, hemos llevado a cabo, porque aunque el nombre del autor de esta tesis sea el mío, no podría haber llegado hasta aquí sin la ayuda y el apoyo de tanta gente que ha estado a mi lado estos años. Un simple “gracias” es escaso para todo lo que me gustaría agradecer el soporte que me habéis dado.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. M^a Ángeles Navas el haberme dado la oportunidad de trabajar con ella, y como no todo su apoyo, consejos y enseñanzas, porque no solo ha tutorizado este trabajo, si no que me ha guiado en el mundo de la investigación y los conocimientos adquiridos con ella serán útiles en casi todos los ámbitos.

También me gustaría agradecer a todos los compañeros del departamento los buenos momentos compartidos y el gran ambiente de trabajo en el que me he sentido como en casa durante todo el tiempo en el que he estado, y lo bien que me han tratado todos, desde los más veteranos hasta los más noveles. En especial gracias a los integrantes del grupo del Dr. Enrique Blázquez, con los que he trabajado codo con codo, Juan Miguel, Esther, Elvira, Carmen, Yannick, Ana, Vero y Pilar, y no se me olvida tampoco Nuria en representación de las “compañeras de planta” aunque yo he estado más tiempo en otras.

También quisiera agradecer la inestimable colaboración del Dr. Olivier Vincent y de su laboratorio, en los ensayos de doble híbrido y Western, además de haber compartido consejos y recomendaciones.

Pero sobre todo me gustaría agradecer especialmente a mi familia y amigos, que no solo me han apoyado todos estos años, si no que me han tenido que soportar, algo que incluso a mí mismo me ha costado en ocasiones. Sobre todos ellos, a mis padres Ángel y Solé, como mi hermana Arantxa fueron mi soporte principal en los primeros momentos, pero poco a poco Patricia ha ido aguantándome cada vez más, muchas gracias especialmente a los cuatro. No me podría olvidar tampoco de Miguel, Jesús y Magdalena, “la familia política” que es también mi familia de sentimiento.

En fin, podría agradecer a tanta gente sus ánimos y apoyo que los agradecimientos podrían ocupar un libro, simplemente pedir perdón y dar las gracias también a mucha gente cuyo nombre debería estar aquí, de los cuales no me he olvidado, como los compañeros que estaban cuando llegué, los que han pasado y con los que he compartido tiempo y trabajo, o los amigos que me han apoyado los fines de semana de “partiditas”.

¡¡GRACIAS!!

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN/SUMMARY.....	21
INTRODUCCIÓN.....	35
1. Función de la glucokinasa.....	38
1.1 Papel de la glucokinasa en células del eje neuroendocrino.....	43
1.2 Papel de la glucokinasa hepática.....	44
1.3 Modelos experimentales de supresión o sobreexpresión de glucokinasa.....	46
1.4 Patologías asociadas a la glucokinasa humana mutada.....	50
2. Biología molecular de la glucokinasa.....	54
2.1 Estructura de la glucokinasa, modelo cinético y cooperatividad por glucosa.....	54
2.2 Regulación de la actividad glucokinasa.....	59
2.2.1 Regulación de la expresión génica.....	59
2.2.2 Regulación postranscripcional de la actividad glucokinasa.....	62
2.2.3 Regulación de la glucokinasa por interacción con otras proteínas celulares.....	64
2.2.4 Proteína reguladora de la glucokinasa y regulación de la distribución núcleo-citoplásmica de la enzima.....	66
3. Activadores de la glucokinasa (GKAs) como potenciales agentes terapéuticos para tratar la diabetes.....	76
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	79
MATERIALES Y MÉTODOS.....	83
1. Material biológico.....	85
2. Técnicas.....	95
RESULTADOS.....	107
1. Caracterización funcional de mutaciones implicadas en hipoglucemia por hiperinsulinismo y en hiperglucemia familiar MODY2.....	109
1.1 Localización de los residuos.....	109

1.2 Producción y purificación de las proteínas de fusión GST-GCK silvestre y mutantes.....	110
1.3 Análisis cinético de las proteínas GST-GCK purificadas.....	116
1.4 Análisis de la estabilidad de las proteínas de fusión GST-GCK silvestre y mutantes en función de la temperatura.....	118
1.5 Efecto de las mutaciones del residuo Ala201 en la interacción de la glucokinasa con su proteína reguladora GGRP.....	125
1.5.1 Ensayo de doble híbrido para analizar el efecto de las mutaciones A201T y A201P sobre la interacción GCK-GGRP.....	125
1.5.2 Efecto de las mutaciones del residuo Ala201 sobre la sensibilidad de la glucokinasa a la inhibición de su actividad por GGRP-Flag.....	126
1.6 Identificación de otras mutaciones MODY2 que implican pérdida de interacción de la glucokinasa con la GGRP.....	127
1.6.1 Caracterización funcional de las mutaciones MODY2 T60I y A201S.....	132
1.6.2 Efecto de las mutaciones T60I y A201S sobre la interacción de la glucokinasa con su proteína reguladora GGRP.....	138
1.7 Localización subcelular de los mutantes MODY2 de pérdida de interacción con GGRP.....	141
2. Caracterización funcional de mutaciones MODY2 localizadas en la señal de exportación nuclear (NES) de la glucokinasa.....	148
2.1 Ubicación de la señal de exportación nuclear en la estructura tridimensional de la glucokinasa y de las mutaciones analizadas.....	148
2.2 Localización subcelular de la proteína ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ -GFP.....	151
2.3 Análisis cinético y de estabilidad proteica de proteínas GST-GCK portadoras de mutaciones en la secuencia NES de la glucokinasa.....	172
2.4 Efecto de las mutaciones de la secuencia NES sobre la interacción de la glucokinasa con su proteína reguladora GGRP.....	173

2.4.1 Efecto de las mutaciones de la NES sobre la localización subcelular de la glucokinasa en células que coexpresan GKRP.....	174
2.4.2 Efecto de las mutaciones de la NES sobre la interacción de la glucokinasa con la GKRP en el sistema de doble híbrido en levadura.....	181
DISCUSIÓN.....	187
1. Efecto de las mutaciones sobre la cinética enzimática y la estabilidad proteica.....	190
1.1 Efecto de las mutaciones localizadas en el dominio menor sobre la cinética enzimática y la estabilidad proteica.....	191
1.2 Efecto de las mutaciones localizadas en el dominio mayor.....	194
2. Efecto de las mutaciones MODY2 sobre la localización núcleo-citoplásmica.....	198
2.1 Efecto de las mutaciones sobre la interacción con la proteína reguladora GKRP.....	198
2.2 Efecto de las mutaciones sobre la señal de exportación nuclear de la glucokinasa.....	206
CONCLUSIONES.....	213
BIBLIOGRAFÍA.....	217

ABREVIATURAS

A _{340nm}	Absorbancia a 340 nm.
APS	Persulfato amónico (<i>Ammonium persulfate</i>)
ATCC	Colección americana de cultivos modelo (<i>American Type Culture Collection</i>)
BAD	Proteína promotora de muerte celular asociada a Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated death promoter</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino
CRM1	Región de mantenimiento cromosómico 1/Exportina 1 (<i>chromosome región maintenance</i>)
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Medio de Dubbelco modificado por Eagle (<i>Dubbelco's Modified Eagle Medium</i>)
DPP4	Dipeptidil peptidasa 4
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EMA	Agencia europea de medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>)
F1P	Fructosa 1-fosfato
F6P	Fructosa 6-fosfato
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (<i>US Food and Drugs Administration</i>)
Fru-2,6-P2	Fructosa 2,6-bisfosfato
G6P	Glucosa 6-fosfato
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GCK	Glucokinasa
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GKA	Activador de la glucokinasa (<i>Glucokinase activator</i>)
GKRP	Proteína reguladora de la glucokinasa
GLP-1	Péptido similar al glucagón 1 (<i>Glucagon-Like Peptide 1</i>)
GST	Glutation-S-transferasa
h	Coeficiente de Hill
HA	Hemaglutinina
HbA _{1c}	Hemoglobina glicosilada

HH	Hiperglucemia hiperinsulinémica
HRP	Peroxidasa de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HXK	Hexokinasa
Iar	Índice de actividad relativo
IDF	Federación internacional de diabetes (<i>International Diabetes Federation</i>)
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactosido
Kcat	Constante catalítica
Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MEM	Medio mínimo esencial de Eagle (<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>)
MODY	Diabetes de la madurez debut juvenil (<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>)
MRK	2-amino-4-fluoro5-[(1-metil-1H-imidazol- 2-YL)sulfanil]-N-(1,3-tiazol-2-YL)benzamida
NADP/NADPH	Nicotin-adenín dinucleótido fosfato (Oxidado/Reducido)
NES	Señal de exportación nuclear
NGS	Suero de cabra (<i>Normal Goat Serum</i>)
NLS	Señal de localización nuclear
nNOS	Óxido nítrico sintasa, isoforma neuronal
NPC	Complejo del poro nuclear (<i>Nuclear Pore Complex</i>)
OD _{600nm}	Densidad óptica a 600nm
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS	Tampón fosfato salino
PDB	Banco de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PFK2-Pasa	Enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-kinasa-2,6-bisfosfatasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNDM	Diabetes mellitus neonatal permanente (<i>Permanent Neonatal Diabetes Mellitus</i>)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RanBP	Proteína de unión a Ran (<i>Ran Binding Protein</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sustrato

S6P	Sorbitol 6-fosfato
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico.
SGLT2	Cotransportador de Sodio-Glucosa 2 (<i>Sodium-Glucose co-transporter 2</i>)
SIS	Dominio isomerasa de azúcares (<i>Sugar Isomerase Site</i>)
TBS-T	Tampón tris salino con Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TNDM	Diabetes mellitus neonatal transitoria (<i>Transient Neonatal Diabetes Mellitus</i>)
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
U	Unidad enzimática

RESUMEN/ SUMMARY

Título de la Tesis: *Estudio del mecanismo de translocación núcleo-citoplasma de la glucokinasa mediante la caracterización funcional de mutaciones asociadas a hiperglucemia familiar MODY2.*

Introducción: La forma más común de diabetes mellitus es la diabetes tipo 2, donde la hiperglucemia está causada por una combinación de defectos en la secreción y en la acción de insulina. Esta enfermedad supone actualmente un gran problema de salud pública a nivel mundial y se prevé un fuerte incremento de su prevalencia en los próximos años. Por ello es de gran importancia la disponibilidad de terapias antidiabéticas efectivas. En las últimas décadas, la enzima glucokinasa (GCK) está siendo considerada como una potencial diana terapéutica debido a su papel central en la homeostasis de glucosa, lo que ha resultado en el descubrimiento de moléculas activadoras de esta enzima (GKAs).

La glucokinasa es una de las cuatro isoformas de hexokinasa que cataliza el primer paso limitante en el metabolismo de la glucosa convirtiéndola en glucosa 6-fosfato (G6P) y utilizando ATP como segundo sustrato. Esta enzima se expresa en una restringida variedad de tipos celulares. En la célula β pancreática la GCK actúa como sensor de glucosa al integrar las variaciones de glucosa en sangre y su metabolismo con la secreción de insulina. En el hepatocito, a través de la producción de G6P, la actividad GCK regula el ritmo de acumulación de glucógeno a partir de glucosa, la glicolisis y la gluconeogénesis. El papel central de la actividad GCK en la homeostasis de glucosa lo corroboran las casi 700 mutaciones asociadas a distintos síndromes glucémicos. Mutaciones que incrementan la actividad GCK producen hipoglucemia por hiperinsulinismo. Por el contrario, mutaciones que hacen disminuir la actividad enzimática producen

hipoinsulinismo e hiperglucemia. En heterocigosis las mutaciones inactivantes dan lugar a una forma de hiperglucemia familiar denominada *maturity onset diabetes of the young 2* (MODY2) y en homocigosis producen diabetes neonatal permanente.

La función de la glucokinasa es debida a sus características cinéticas particulares que no presentan otras isoformas de hexokinasa: baja afinidad y cooperatividad por glucosa y falta de inhibición por producto. Estas características son conferidas por la estructura tridimensional de la enzima y explicadas en un modelo cinético en el que la glucosa induce cambios entre distintas conformaciones. Su estructura proteica está compuesta de un dominio mayor y un dominio menor, separados por una región bisagra. En ausencia de sustratos, la GCK se dispone en una conformación abierta inactiva y tras la unión de glucosa los dominios se aproximan dando lugar a la conformación cerrada y activa. Un aspecto importante de la regulación de la actividad glucokinasa es su modulación por interacción con otras proteínas, que a su vez determinan su localización subcelular. El principal regulador de la glucokinasa en el hepatocito es su proteína reguladora (GKRP) que inhibe a la enzima y la secuestra en el núcleo celular en su conformación abierta inactiva durante el ayuno. La formación del heterodímero es promovida por la baja concentración de glucosa y por la unión de fructosa 6-fosfato a la GKRP. Tras la ingesta, la unión de glucosa a la GCK y de fructosa 1-fosfato a la GKRP promueven cambios conformacionales y la disociación del complejo, permitiendo la salida de la enzima al citoplasma gracias a la existencia de una señal de exportación nuclear (NES) presente entre los residuos 300 a 310.

Hipótesis y objetivos: A pesar de que ha transcurrido más de una década desde que se descubrieron los primeros GKAs, aún no se ha conseguido desarrollar ningún

fármaco antidiabético efectivo derivado de ellos. Incrementar el conocimiento de los mecanismos de regulación de la glucokinasa podría contribuir al éxito de su desarrollo. Debido a que mas del 99% de la glucokinasa total del organismo se encuentra en el hígado, el objetivo principal de este trabajo ha sido el de analizar los mecanismos moleculares de la translocación núcleo-citoplasma de la enzima, la cual constituye una de las principales formas de regulación en los hepatocitos. Para ello se propuso caracterizar funcionalmente un grupo de mutaciones identificadas en pacientes con alteraciones en la homeostasis de glucosa, determinando los efectos causados sobre los parámetros cinéticos, la estabilidad proteica, la interacción con la GGRP y la actividad de la secuencia NES de la glucokinasa.

Materiales y Métodos: Mediante mutagénesis dirigida se introdujeron las mutaciones en el cDNA de la glucokinasa de célula β humana. El análisis cinético de los mutantes y su estabilidad en función de la temperatura, se llevaron a cabo *in vitro* mediante ensayos enzimáticos de proteínas de fusión a la glutation-S-transferasa (GST-GCK) purificadas desde bacteria. La interacción GCK-GGRP se analizó *in vitro* mediante inhibición enzimática a distintas concentraciones de GGRP humana recombinante, y mediante el ensayo de doble híbrido en levadura. El efecto de las mutaciones sobre la localización subcelular de la glucokinasa dependiente de GGRP se llevó a cabo analizando la distribución subcelular de fusiones a la proteína verde fluorescente (GFP-GCK) y a mCherry (GGRP-mCherry) en células HepG2. Para estudiar el efecto de las mutaciones sobre la actividad de la NES de la GCK, independientemente de GGRP, se analizó la distribución subcelular de la fluorescencia de la fusión de un fragmento de la gck de rata que contiene la NES fusionado a la GFP (ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP) en células HEK293T. La localización subcelular se determinó mediante microscopía de fluorescencia y confocal.

Resultados y discusión: Nuestros resultados muestran que todas las mutaciones analizadas alteran la actividad catalítica de la glucokinasa de acuerdo con el fenotipo clínico de los pacientes en los que fueron identificadas. La mutación W99C, identificada en una paciente con hipoglucemia por hiperinsulinismo y localizada en el sitio alostérico de la GCK, resulta en la activación de la enzima al aumentar la constante catalítica K_{cat} y la afinidad por los sustratos (disminuyen los valores de $S_{0.5}$ para glucosa y K_m para ATP), y reducir la cooperatividad por glucosa. Por el contrario, las mutaciones identificadas en los pacientes MODY2 se localizan en los distintos dominios proteicos e inactivan a la enzima afectando a los distintos parámetros cinéticos. No obstante, los defectos producidos por las distintas mutaciones varían en función de la propia sustitución de aminoácido y de su ubicación en la estructura de la proteína, de tal manera que además de, en general, reducir la K_{cat} y las afinidades por los sustratos, algunas mutaciones inducen fuerte inestabilidad en la enzima. Estos efectos, que afectan a la glucokinasa expresada en los distintos tipos celulares se traducirían *in vivo* en las correspondientes variaciones del umbral de glucosa plasmática necesario para que las células β pancreáticas secreten insulina, justificando el fenotipo clínico de los pacientes.

Por otro lado, nuestros resultados demuestran que mutaciones MODY2 que implican residuos de la región bisagra o de la hélice α -8 pueden afectar a la distribución núcleo-citoplásmica de la enzima. Todas las mutaciones que resultan en la sustitución de los residuos Thr60 y Ala201, ubicados en la región bisagra y contiguos a residuos que forman las superficies de contacto con la GKR, impiden la unión de la glucokinasa con su proteína reguladora, ya que los correspondientes mutantes de glucokinasa son insensibles a la inhibición por GKR, no interaccionan en el ensayo de doble híbrido y permanecen en el citoplasma sin translocarse al núcleo celular. En el caso de las

mutaciones L306R y L309P ubicadas en la hélice α -8, la ausencia de localización nuclear podría explicarse por desestabilización proteica de los correspondientes mutantes. Por último, el análisis de las mutaciones MODY2 que implican residuos de la hélice α -8 han permitido caracterizar la NES de la glucokinasa. Nuestros resultados confirman la presencia de una NES activa en la proteína de fusión ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP, cuya actividad es mediada por CRM1/exportina1. La actividad de esta NES, que se ajusta al consenso de la clase 1b ($\phi_1XX\phi_2XX\phi_3X\phi_4$, donde ϕ son residuos hidrofóbicos y X residuos espaciadores) es alterada por mutaciones MODY2 que afectan a los residuos Glu300, Val302, Arg303, Leu304, Leu306, Arg308 y Leu309, siendo las leucinas 304 y 309 los residuos hidrofóbicos ϕ_2 y ϕ_4 y el resto residuos espaciadores. Hemos observado el mayor efecto activador en las mutaciones que sustituyen al Glu300 y el mayor efecto inactivante en la mutación L304P.

Conclusiones: La caracterización funcional de las mutaciones ha demostrado que éstas son patogénicas y no polimorfismos raros, proporcionando un diagnóstico molecular que confirma el diagnóstico clínico y genético. El estudio funcional ha permitido aportar nuevos datos sobre el mecanismo de translocación entre el núcleo y el citoplasma. Hemos identificado residuos de la glucokinasa necesarios para la interacción con la GKRP y, por tanto, su translocación al núcleo. Además hemos demostrado la existencia de residuos en la NES que modulan negativamente su actividad, mientras que otros lo hacen de forma positiva, confirmando la necesidad de una estructura y actividad equilibrada para permitir el correcto funcionamiento de la señal de exportación nuclear.

Title: *Study of the nucleus-cytoplasmic translocation mechanism of glucokinase by functional characterization of MODY2 mutations.*

Introduction: Type 2 diabetes mellitus (T2DM), the most common form of diabetes caused by impairment of insulin secretion and action, is an increasing worldwide health problem. Effective antidiabetic drugs are necessary and many new agents are currently under development. The metabolic enzyme glucokinase (GCK) plays a central role in glucose homeostasis, thus it has been considered as a potential target in T2DM treatment. Research efforts during the last two decades have discovered molecules that act as glucokinase activators (GKAs). However, despite the antidiabetic potential of these GKAs, the development of reliable new therapeutic agents has not yet been successful.

Glucokinase catalyzes the first limiting step of glucose utilization. Like other hexokinases, GCK transfers a phosphate group from ATP to glucose forming glucose 6-phosphate (G6P). *GCK* expression is restricted to cells with important roles in glucose homeostasis. In pancreatic β cells, glucokinase acts as a glucosensor by integrating blood glucose levels and its metabolism with insulin secretion. More than 99% of total glucokinase content is expressed in the liver, where its activity controls glycogen accumulation, glycolysis and gluconeogenesis rates. The importance of glucokinase in glucose homeostasis is illustrated by the fact that nearly 700 mutations in *GCK* are associated with human monogenic glycemic disorders. Activating mutations are associated with hyperinsulinemic hypoglycemia (HH). Heterozygous inactivating mutations cause maturity-onset diabetes of the young subtype 2 (MODY2) and

homozygous inactivating mutations result in permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM).

The specific function of glucokinase is based on the particular kinetic characteristics of this enzyme. Unlike other hexokinases, GCK shows low affinity for glucose, cooperativity with this substrate, and a lack of end-product inhibition at physiological concentrations of G6P. These differences are conferred by the GCK protein structure. Glucokinase has a bipartite structure comprising a large domain and a small domain connected by a hinge region. Multiple conformational states have been identified. In the absence of glucose, glucokinase has an inactive super-open conformation. Conversely, when glucokinase is bound to glucose, the enzyme adopts an active closed conformation. Accordingly, cooperativity is attributed to glucokinase conformational changes from super-open to closed conformations induced by glucose. In addition, glucokinase is regulated through protein-protein interactions by the glucokinase regulatory protein (GKRP), which inhibits the enzyme and also regulates its nucleus-cytoplasmic localization in hepatocytes. GCK-GKRP interaction is potentiated by fructose 6-phosphate (F6P) and counteracted by fructose 1-phosphate (F1P) after binding to GKRP. During fasting, GKRP-F6P anchors the super-open GCK allowing its import into the nucleus. Conversely, after feeding, GCK adopts its active glucose-bound closed conformation and dissociates from GKRP-F1P prior to being exported from the nucleus to the cytoplasm. The enzyme nuclear export is mediated by a nuclear export signal (NES) located within residues 300 to 310.

Aims and hypothesis: A better understanding of GCK regulation may be useful for developing reliable new therapeutic agents based on GKAs. The main goal of this work has been to analyze the molecular mechanisms for GCK nucleus-cytoplasmic translocation, which is a very important form of regulation for hepatic GCK. To achieve this objective, we have characterized a set of naturally occurring mutations of GCK identified in patients with altered glucose homeostasis. We have analyzed the effects of mutations on glucokinase kinetic parameters and protein stability, GCK-GKRP interaction and glucokinase NES activity.

Methods: Mutations were introduced into the human β -cell GCK cDNA by directed mutagenesis. GCK mutants fused to Glutathione-S-Transferase (GST-GCK) were purified from bacteria and used to perform kinetic analysis and thermal stability assays. GCK-GKRP interaction was analyzed *in vitro* through enzymatic inhibition assays with purified human GKRP and in the yeast two-hybrid system. To determine the effects of GCK mutations on GKRP-dependent nuclear import, the subcellular distribution of GCK tagged with green fluorescent protein (GFP-GCK) and GKRP-mCherry fusion proteins was analyzed in HepG2 cells. The effects on the NES function were studied by analyzing the subcellular distribution of the fusion protein ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP in HEK293T cells. Subcellular distribution of fusion proteins was assessed by fluorescence microscopy.

Results and discussion: Our results show that all the mutations had effects on enzymatic activity depending on the patient clinical phenotypes. The W99C mutation, located within the glucokinase allosteric site, was identified in a patient with HH-GCK. This mutation activates glucokinase by increasing K_{cat} and substrate affinities (lowering $S_{0,5}$ for glucose and K_m for ATP). Moreover, it decreases glucose cooperativity. Conversely, the MODY2 mutations inactivate glucokinase. Although the disturbing effects vary

depending on the nature of the mutation, in general, MODY2 mutations lower K_{cat} and affinity for substrates. Moreover, some mutations induce protein instability. These effects, which affect glucokinase expressed in the different cell types, would be translated *in vivo* into the corresponding variations in the plasma glucose threshold necessary for pancreatic β cells to secrete insulin, thus justifying the clinical phenotype of the patients.

On the other hand, our results demonstrated that MODY2 mutations located in the hinge region or in the α -helix 8 might impair GCK nucleus-cytoplasmic distribution. Substitutions of residues Thr60 and Ala201, which are located in the hinge region, close to the GKRP contact surfaces, prevent GCK-GKRP interaction. The respective mutants were insensitive to GKRP inhibition, did not interact with GKRP in the yeast two-hybrid assays and were not imported into the nucleus of transfected cells. However, in the case of L306R and L309P mutations, located in the α -helix 8, the absence of nuclear localization could be explained by protein destabilization.

Finally, the study of MODY2 mutations in the α -helix 8 has allowed characterizing the nuclear export signal of glucokinase. Our results confirm the presence of an active NES in the ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP fusion protein which is dependent on CRM1/exportin1 activity. Glucokinase NES fits a type 1b consensus sequence (ϕ 1XX ϕ 2XX ϕ 3X ϕ 4, where ϕ is hydrophobic and X can be any spacer residue). The MODY2 mutations tested, which affect residues Glu300, Val302, Arg303, Leu304, Leu306, Arg308 and Leu309 alters ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP exporting activity. The extent of effects depended on the mutation. Substitutions of Glu300 enhanced the exporting activity. In contrast, the most inactivating effect was caused by the L304P mutation which occupies the ϕ 2 position in the NES.

Conclusion: The functional characterization of the mutations analyzed in this work has demonstrated that all of them are pathogenic and not rare polymorphisms, providing a molecular diagnosis that confirms the clinical and genetic diagnosis of the patients. Moreover, the functional study has extended the molecular knowledge of glucokinase and contributed new data on the mechanism of its nucleus-cytoplasmic translocation. We have identified some glucokinase residues necessary for interaction with GKRP and, therefore, its translocation into the nucleus. In addition, we have demonstrated the existence of residues in the NES that negatively modulate its activity, while others do so in a positive way, confirming the need for a structure and a balanced activity to allow the proper functioning of the export signal.

INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus comprende un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia derivada de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambos. A largo plazo, la hiperglucemia crónica se asocia con disfunción de múltiples órganos como ojos, riñones, corazón, vasos sanguíneos y sistema nervioso. Hay múltiples procesos patológicos involucrados en el desarrollo de la diabetes, desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas (diabetes mellitus tipo 1), hasta la pérdida de sensibilidad a la acción de la insulina, que suele acompañarse de una secreción inapropiada de insulina resultante de la disfunción de las células beta pancreáticas (diabetes mellitus tipo 2) (revisado en(1)).

La diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), supone un gran problema de salud pública en todo el mundo. La Federación Internacional de Diabetes (IDF) calcula que el número de diabéticos aumentará de los casi 400 millones diagnosticados en la actualidad a casi 600 millones en el 2035 (2). En Estados Unidos la tasa de prevalencia entre individuos mayores de 20 años aumentó un 1% entre 2011 y 2012 (3), y en España un estudio epidemiológico estima que casi un 30% de la población mayor de 18 años presenta alteraciones de los niveles de glucosa circulantes (4). Por ello, es de gran importancia la disponibilidad de terapias antidiabéticas efectivas.

El deterioro progresivo de la enfermedad, especialmente en cuanto a la funcionalidad del hígado, el músculo y las células β pancreáticas, contribuye a que los fármacos antidiabéticos sufran una paulatina pérdida de efectividad (5). Hoy en día existen distintos tipos de fármacos para el tratamiento de la diabetes cuyos mecanismos de acción abarcan desde la estimulación de la secreción de insulina (ej. sulfonilureas) o la sensibilidad a esta suprimiendo la producción de glucosa hepática (ej. metformina),

hasta la inducción de glucosuria (inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2; SGLT2) (Tabla 1). No obstante, actualmente se están desarrollando nuevos fármacos, aún en fase experimental, dirigidos a nuevas dianas estratégicas, entre los que se encuentran moléculas activadoras de la glucokinasa (GKAs) (revisado en (6)). Esta enzima metabólica se considera una potencial diana terapéutica debido a su importante papel en la homeostasis de la glucosa.

1. Función de la glucokinasa.

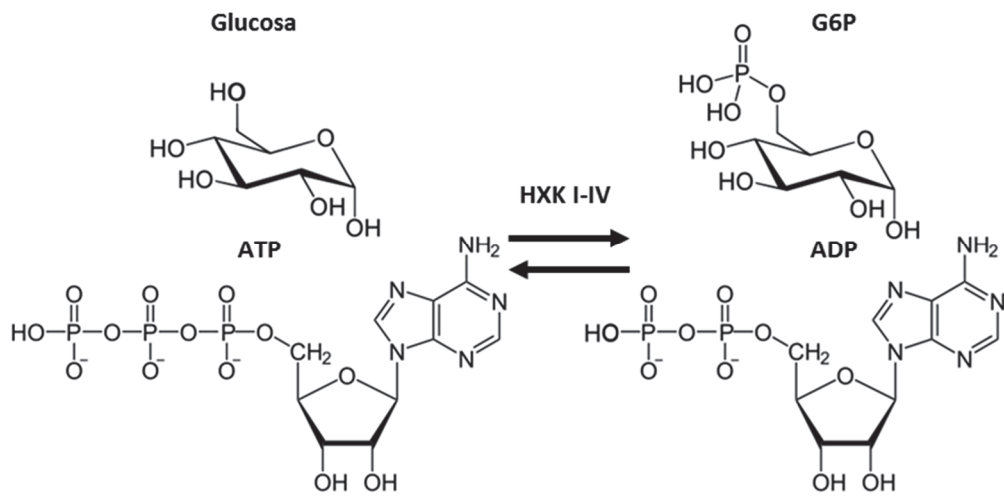
La glucokinasa (ATP: D-glucosa-6-fosfotransferasa; EC 2.7.1.1), también denominada hexokinasa IV o hexokinasa D, cataliza la fosforilación de la glucosa en posición 6, utilizando ATP como segundo sustrato, para formar glucosa 6-fosfato y ADP (Figura 1A). Sus características cinéticas y su distribución restringida a unos pocos tipos celulares la diferencian claramente del resto de hexokinasas. En contraste con otras hexokinasas, la glucokinasa presenta una afinidad por glucosa mucho menor ($S_{0,5} \approx 7$ mM), cooperatividad por este sustrato (coeficiente de Hill (h) $\approx 1,6$) y no es inhibida por concentraciones fisiológicas de los productos de la reacción, lo que le permite actuar de manera óptima en el rango fisiológico de glucosa plasmática (4 – 10 mM) (Figura 1B). Esta enzima es expresada principalmente en los hepatocitos pero también en células sensoras de glucosa contenidas en órganos como el páncreas, intestino y cerebro, que constituyen el denominado eje neuroendocrino. La actividad glucokinasa en estos distintos tipos celulares juega un papel crucial en la regulación de la homeostasis de la glucosa del organismo (7).

Cuando la glucokinasa (GCK) se describió por primera vez en 1964 se pensó que su expresión se daba exclusivamente en el hígado (8-10). Sin embargo, pronto se demostró su presencia en islotes pancreáticos, proponiéndose su implicación en la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células β y en la síntesis de glucógeno en hepatocitos (11). Posteriormente se ha descrito la expresión y función de la glucokinasa en otras células del denominado eje neuroendocrino que incluyen células α y δ pancreáticas, células enteroendocrinas tanto del estómago como del intestino delgado, tejido hipotalámico, tronco encefálico, células epiteliales del tracto respiratorio e incluso en células gonadotropas y tirotropas de la glándula pituitaria (Figura 2) (revisado en (12)). El papel que juega la glucokinasa en la homeostasis de la glucosa se debe principalmente a su capacidad glucosensora, ya que al catalizar la fosforilación de la glucosa, regula la entrada de este azúcar en el metabolismo celular.

Clase de compuesto terapéutico	Mecanismo de acción	Observaciones
Biguanidas	Aumenta la sensibilidad a insulina; suprimen la producción de glucosa hepática	Tratamiento de primera elección. Efectos gastrointestinales secundarios, lactoacidosis
Sulfonilureas	Estimulan la secreción de insulina	Riesgo de hipoglucemia, ganancia de peso
Glinidas	Estimulan la secreción de insulina	Riesgo de hipoglucemia, ganancia de peso, vida media corta
Tiazolidinedionas	Disminuyen la resistencia a insulina por activar el receptor de PPAR γ	Aumenta el riesgo cardiovascular, ganancia de peso, fragilidad ósea, retención de líquidos
Inhibidores de α -glucosidasa	Reducen la absorción intestinal de glucosa	Efectos secundarios a nivel gastrointestinal
Inhibidores de DPP4	Estimulan la secreción de insulina, aumentan la vida media de GLP-1, disminuyen los niveles de glucagón	Aumentan el riesgo de cáncer de tiroides, médula ósea y páncreas; aumentan el riesgo de pancreatitis
Agonistas de GLP-1	Estimulan la secreción de insulina, disminuyen los niveles de glucagón	Aumentan el riesgo de cáncer de tiroides, médula ósea y páncreas; aumentan el riesgo de pancreatitis; solo inyectables
Inhibidores de SGLT-2	Disminuyen el umbral de excreción renal de glucosa	Efectos diuréticos, pérdida de peso, mayor riesgo de infecciones urinarias
Secuestrantes de ácidos biliares	Activan el receptor X de farnesoides/ receptor de ácidos biliares	Desarrollo como fármaco para la disminución de lipidemia
Agonistas de dopamina	Modifican la resistencia central a insulina	Hipotensión y náuseas
Análogos de amilina	Ralentizan el vaciado gástrico, efectos saciantes, disminuyen los niveles de glucagón	Hipoglucemia cuando se combinan con otros antidiabéticos
Insulina	Disminuye la glucemia	Muy eficaz para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1

Tabla 1. Fármacos antidiabéticos aprobados en la actualidad para el tratamiento de diabetes mellitus por *US Food and Drug Administration* (FDA) y *European Medicines Agency* (EMA). Se muestran los 12 tipos de fármacos utilizados actualmente, el mecanismo de acción de estos y sus efectos secundarios u otras consideraciones. Adaptado de (6).

A



B

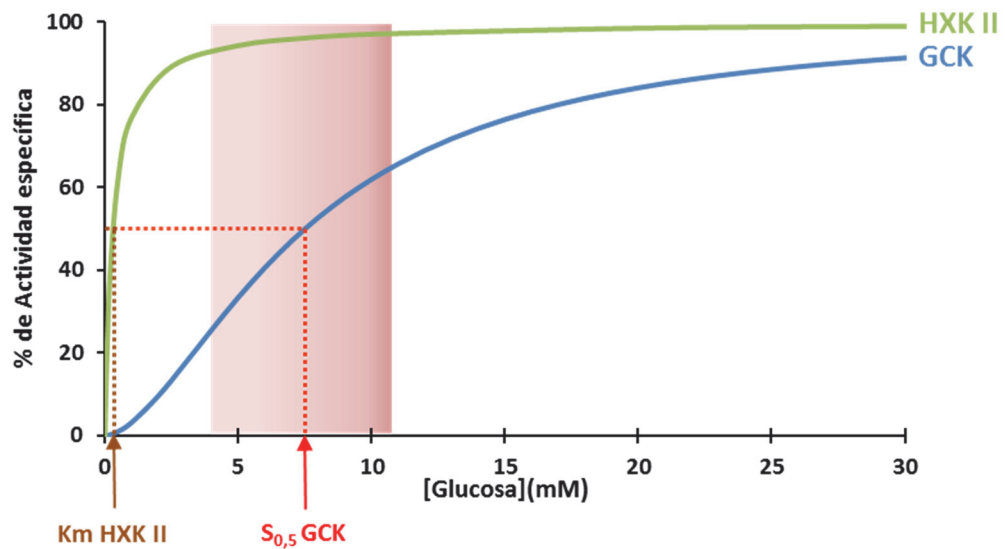


Figura 1. Reacción catalizada por las hexokinases y curvas de saturación por glucosa.

A. Las cuatro isoformas de hexokinases humanas catalizan la transferencia del fosfato y del ATP sobre el carbono 6 de la glucosa dando como productos glucosa 6-fosfato y ADP. B. Se muestran las curvas de saturación de la glucokinasa y de la hexokinasa II en azul y verde, respectivamente. La glucokinasa presenta una cinética sigmoidea respecto a glucosa, a diferencia del comportamiento hiperbólico de las otras hexokinases. Se ha representado el valor de la K_m de la hexokinasa II, el valor de la $S_{0,5}$ de la GCK y se indica en rosa el rango de concentración fisiológica de glucosa en sangre (4-10 mM).

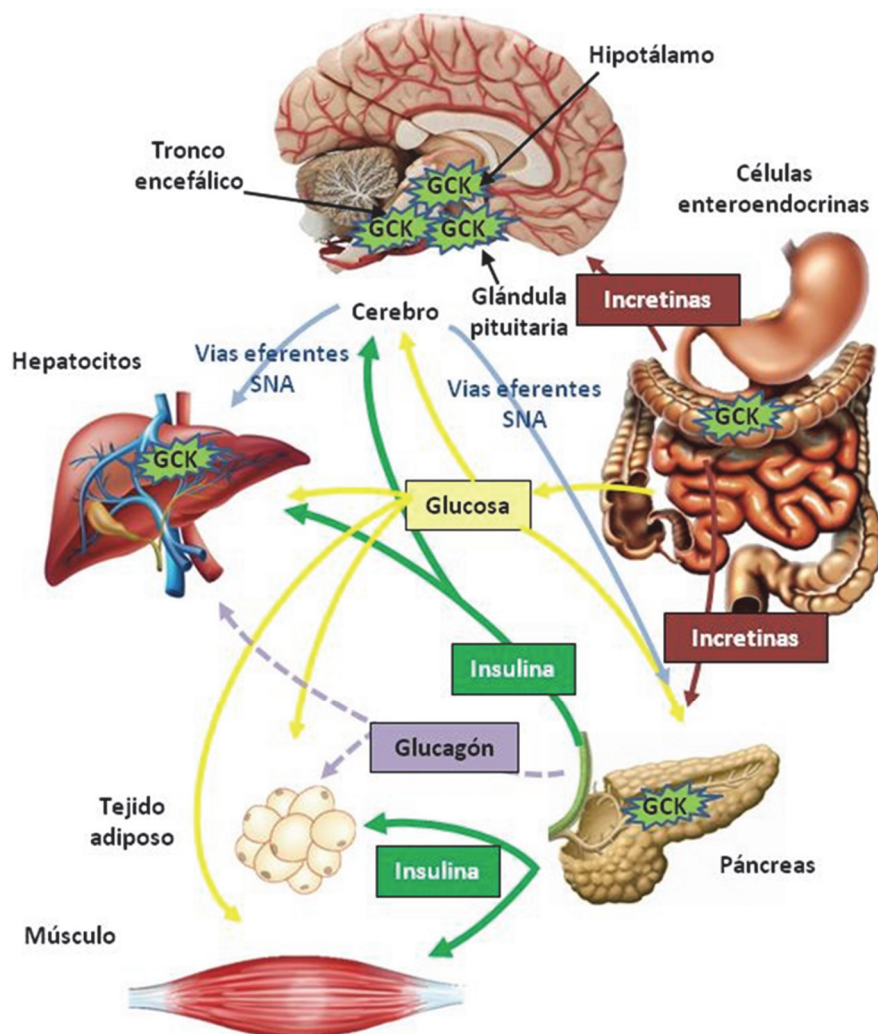


Figura 2. Esquema de la red de tejidos que expresan glucocinasa y señalización llevada a cabo por el eje neuroendocrino. Los tejidos que expresan glucocinasa se han señalado mediante la rotulación GCK resaltada en verde. Además del hígado donde se expresa más del 99% de la glucocinasa total del organismo, se ha observado expresión del gen *GCK* en células α , β y δ del páncreas, células enteroendocrinas, neuronas del tronco encefálico, células hipotalámicas y de la pituitaria. Se muestra en amarillo el flujo de glucosa que es incorporada al organismo desde el sistema digestivo y cuya concentración es el principal factor modulador de la actividad glucocinasa que controla la secreción de insulina y glucagón por parte del páncreas, en cerebro vías eferentes del sistema nervioso autónomo, en células digestivas produce la secreción de incretinas, en la pituitaria regula la liberación de gonadotropinas y en hepatocitos modula el metabolismo celular. Los principales órganos diana para la insulina liberada por el páncreas son el hígado, tejido adiposo y músculo, donde estimula la captación y utilización de glucosa, junto al cerebro donde además de efectos sobre el metabolismo parece tener efectos neuromoduladores, neurotróficos y neuroprotectores (13). A su vez, tanto vías eferentes del sistema nervioso autónomo como las incretinas modulan la secreción de hormonas pancreáticas. SNA. Sistema Nervioso Autónomo. Adaptado de (14).

1.1 Papel de la glucokinasa en células del eje neuroendocrino.

La insulina es sintetizada y secretada por las células β pancreáticas en respuesta a aumentos de la glucemia. La glucokinasa en estas células actúa como sensor de glucosa, permitiendo acoplar la secreción de insulina a las variaciones de glucosa circulante (12). Aunque la secreción de insulina puede ser estimulada por aminoácidos, cetoácidos y ácidos grasos, la glucosa es el principal estímulo fisiológico (15). La entrada de glucosa a la célula β pancreática es facilitada por el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2), el cual presenta baja afinidad por glucosa y es muy abundante en este tipo celular, lo que confiere alta capacidad de transporte, equilibrando rápidamente la concentración de glucosa intracelular con la plasmática (16). Las características cinéticas de la glucokinasa permiten que la concentración de glucosa sanguínea determine la velocidad de su metabolismo en las células β pancreáticas. La ausencia de inhibición por glucosa 6-fosfato (G6P) y la práctica inexistencia de metabolismo del glucógeno, hacen que sean la concentración de glucosa intracelular (prácticamente idéntica a la plasmática), la de ATP (generalmente saturante) y la actividad glucokinasa, los factores que regulan el flujo glucolítico en células β pancreáticas. El ATP generado en la glucólisis y en la oxidación mitocondrial del piruvato da lugar a un incremento en la relación ATP/ADP intracelular que ocasiona el cierre de canales de K^+ dependientes de ATP, despolarización de la membrana plasmática y, en consecuencia, la apertura de canales de Ca^{2+} operados por voltaje. El aumento de Ca^{2+} intracelular y otros segundos mensajeros cooperan en la secreción de insulina (Figura 3A) (revisado en (12)).

Los mecanismos de actuación de la glucokinasa en otras células del eje neuroendocrino sensor de glucosa se conoce en menor medida que en las células β

pancreáticas. Este es el caso de la secreción de glucagón por las células α pancreáticas, gonadotropas de la pituitaria o células enteroendocrinas (12, 17).

En el cerebro, la glucokinasa se expresa en distintas poblaciones neuronales del hipotálamo y del tronco cerebral, actuando como sensor para regular la homeostasis de glucosa y el apetito. El papel de la glucokinasa neuronal en la regulación de la homeostasis de glucosa parece estar mediado principalmente a través de la actividad de la enzima en los núcleos ventromedial del hipotálamo y medial de la amígdala, regulando la respuesta contrarreguladora a la hipoglucemia (revisado en (18)). Esta enzima juega un papel central en la sensibilidad de estas neuronas a los niveles de glucosa, tanto las excitadas (GE) como las inhibidas por glucosa (GI). El papel de la glucokinasa en la secreción de neurotransmisores por las neuronas GE es similar al descrito para las células β pancreáticas. En el caso de las neuronas GI el mecanismo es menos conocido. Se ha propuesto que el incremento de ATP derivado del metabolismo de la glucosa, a partir de la glucokinasa, resulta en la inhibición de la actividad neuronal debido a la estimulación de bombas Na^+/K^+ ATPasas que hiperpolarizan la membrana (19-21).

1.2 Papel de la glucokinasa hepática.

El 99,9% de la glucokinasa total del organismo se encuentra en el hígado. Además, son las células del parénquima hepático las que presentan una mayor actividad específica comparada con otras células que expresan glucokinasa (12). Su actividad influye fuertemente en el metabolismo intermedio hepático, el cual es crucial para la homeostasis de la glucosa. Tras la ingesta, el hígado capta glucosa de la sangre y la almacena en forma de glucógeno, mientras que durante el ayuno libera glucosa procedente de la gluconeogénesis y de la glucogenolisis. La regulación del metabolismo

hepático depende de la relación hormonal insulina/glucagón, así como de la concentración de glucosa plasmática (22).

En el hígado el transporte de glucosa también es mediado por GLUT2, así la actividad GCK permite que las variaciones en la glucemia se traduzcan rápidamente en cambios en la tasa de fosforilación de glucosa y por lo tanto en la velocidad de su entrada en el metabolismo hepático (23). La G6P producida por la glucokinasa es el punto de partida para la glucólisis, síntesis de glucógeno y ruta de las pentosas fosfato en el hepatocito (Figura 3B). La síntesis y degradación de glucógeno son catalizadas por la glucógeno sintasa, y la glucógeno fosforilasa respectivamente. La glucógeno sintasa utiliza como sustrato UDP-Glucosa generada a partir de G6P en dos reacciones consecutivas. Además, la G6P actúa como activador alostérico de la glucógeno sintasa y facilita la defosforilación e inhibición de la glucógeno fosforilasa (24-28).

Un aumento de G6P provoca un incremento del flujo glucolítico y una mayor producción de piruvato, que es transformado en acetil-CoA en la mitocondria y posteriormente en citrato, activador de la síntesis de ácidos grasos. Además, intermediarios del ciclo de Krebs son punto de partida de la síntesis de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados (29). La ruta de las pentosas fosfato permite obtener, a partir de G6P, NADPH y ribulosa-5-fosfato, necesarios para la síntesis de macromoléculas como lípidos y nucleótidos.

Debido a que, según se describe más adelante, la expresión de la glucokinasa hepática es inducida por insulina, un incremento en la relación insulina/glucagón aumenta el efecto de esta enzima sobre todas estas rutas. El control que ejerce la actividad glucokinasa sobre el metabolismo del glucógeno y en la glucólisis otorga al

hepatocito la capacidad de regular el metabolismo de la glucosa en función de la glucemia.

1.3 Modelos experimentales de supresión o sobreexpresión de glucokinasa.

El papel fisiológico de la glucokinasa en la homeostasis de la glucosa ha quedado confirmado en los múltiples modelos experimentales analizados y fundamentalmente en las patologías asociadas a mutaciones de la glucokinasa en humanos. Ratones deficientes en glucokinasa (*gck* $-/-$), muestran muy bajo contenido de glucógeno hepático y ausencia de secreción de insulina estimulada por glucosa, por lo que mueren como consecuencia de hiperglucemia severa a los pocos días de nacer (30-32). Los heterocigotos (*gck* $+/-$) son viables pero presentan hiperglucemia y alteraciones en la secreción de insulina estimulada por glucosa (30, 32, 33). Por el contrario, la sobreexpresión del gen *gck* en ratones transgénicos incrementa la acumulación de glucógeno hepático, reduce la glucemia y los hace resistentes a desarrollar hiperglucemia e hiperinsulinemia debida a dietas grasas (34-37).

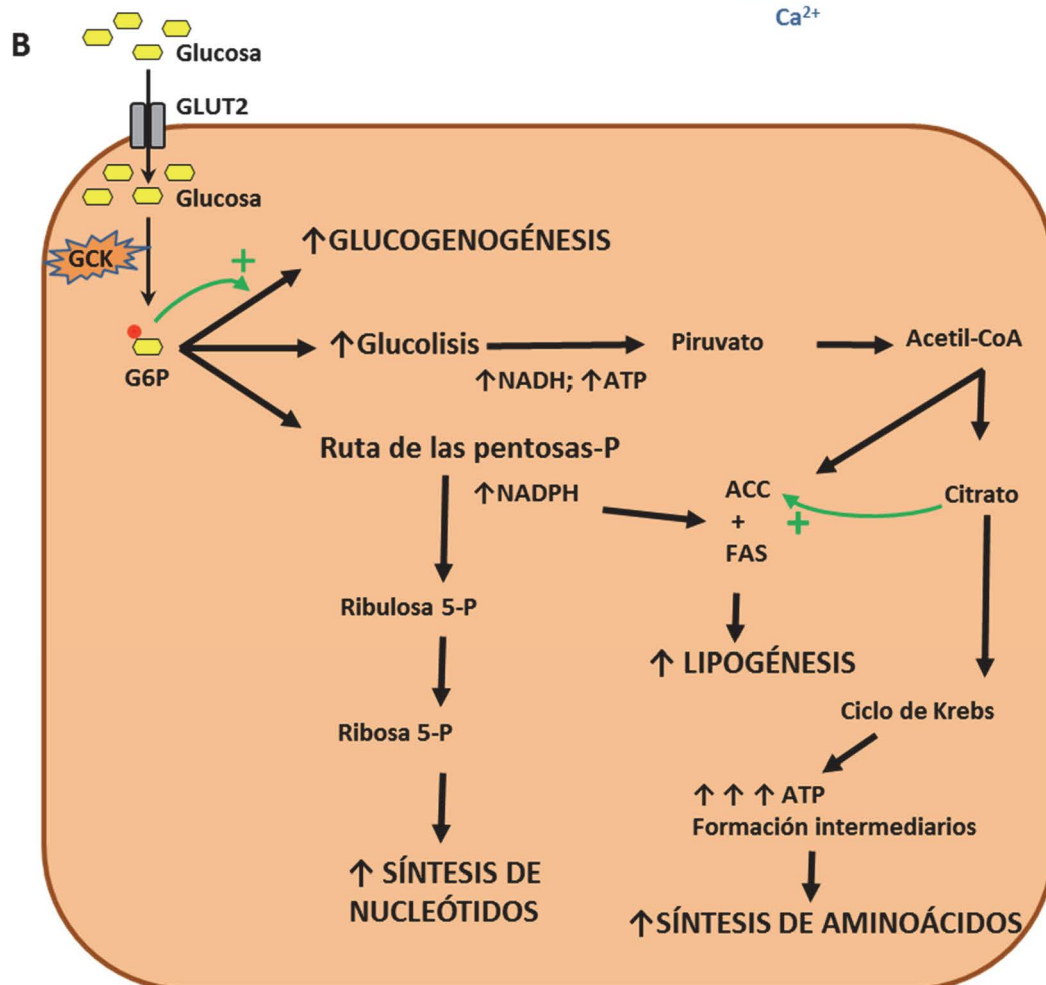
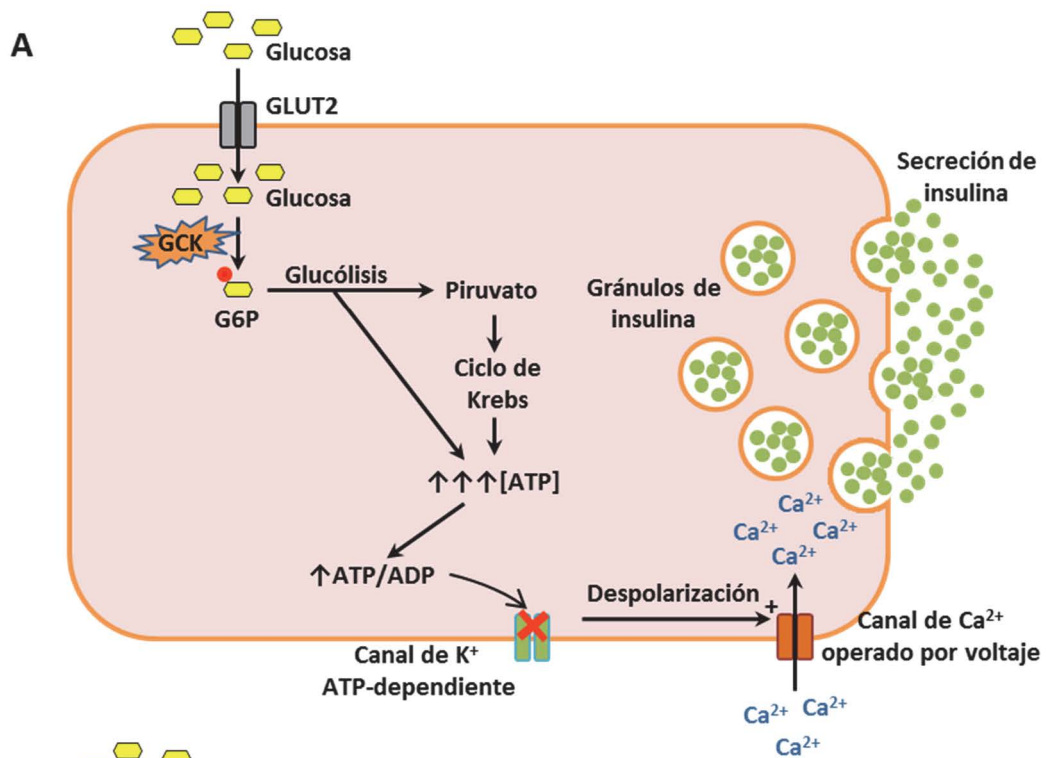
También se han desarrollado modelos animales específicos de tejido y modelos celulares. Ratones homocigotos (*gck* $-/-$) para la isoforma neuroendocrina o específica de células β muestran un fenotipo similar al de ratones con supresión total del gen *gck* (31, 38). La supresión del gen *gck* en células β de ratones adultos resulta en la inhibición de la secreción de insulina e hiperglucemia severa, además de aumentar la apoptosis y disminuir la proliferación de este tipo celular (39). En contraste, los ratones en los que se ha inactivado la forma hepática de la glucokinasa, presentan hiperglucemia y claros defectos en la síntesis de glucógeno así como en la utilización y producción de glucosa

hepática (31, 40). Estos estudios ponen de manifiesto que la glucokinasa de la célula β ejerce un mayor impacto en la homeostasis de glucosa que la isoforma hepática.

La sobreexpresión de glucokinasa en hepatocitos aislados resulta en un aumento de la producción de glucógeno y la oxidación de glucosa, proporcional al incremento de actividad glucokinasa (24, 25, 41). Por el contrario, la sobreexpresión de glucokinasa en islotes pancreáticos aislados, no parece tener un efecto significativo sobre el metabolismo glucídico ni la secreción de insulina comparada con la sobreexpresión de hexokinasa I (42).

En ratones transgénicos, la sobreexpresión moderada de glucokinasa hepática permite disminuir la glucemia a la vez que la insulinemia, sin generar un aumento en los niveles circulantes de triglicéridos (43, 44). Contrariamente, si se observó hipertrigliceridemia en ratas modificadas con adenovirus que presentaban elevada actividad de glucokinasa hepática (45). En modelos de ratones diabéticos, la sobreexpresión de la glucokinasa hepática permitió normalizar la glucemia y disminuir la insulinemia tras una dieta rica en grasas (46).

Figura 3 (Página siguiente). Modelo esquemático de la acción glucosensora de la glucokinasa en la célula β pancreática y en el hepatocito. La glucokinasa juega un papel fundamental regulando la entrada de glucosa en el metabolismo celular. A) Se ilustra el papel de la glucokinasa como sensor de glucosa en una célula β pancreática regulando la secreción de insulina en respuesta a este azúcar. Ante un aumento de glucemia, la glucosa entra en la célula por el transportador GLUT2, la glucokinasa genera G6P que será metabolizada aumentando la concentración de ATP en la célula, a consecuencia de ello se produce el cierre de canales de K^+ dependientes de ATP despolarizándose la membrana y activando canales de Ca^{2+} operados por voltaje, la apertura de estos causa un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular que da lugar a la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática y por tanto a la secreción de esta hormona. B) Se muestra el papel de la glucokinasa en una célula hepática regulando el metabolismo en función de los niveles de glucosa. Ante un aumento de glucemia, la glucosa entra a través del transportador GLUT2 y es fosforilada por la glucokinasa. El aumento de los niveles de G6P derivados de la actividad glucokinasa, además de aumentar glucogenogénesis, da lugar a un aumento de la tasa glucolítica y de la ruta de las pentosas fosfato. El piruvato generado en la glucólisis entra en la mitocondria generando acetil-CoA que se incorpora al ciclo de Krebs. Los fenómenos catabólicos descritos, dan lugar a la producción masiva de energía en forma de ATP y NADPH, además de precursores de aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos, activándose las rutas anabólicas para la síntesis de estos. ACC. Acetil-CoA Carboxilasa. FAS. Ácido graso sintasa. Adaptado de (12).



1.4 Patologías asociadas a la glucokinasa humana mutada.

Mutaciones que afectan al gen de la glucokinasa pueden causar distintas alteraciones en la homeostasis de la glucosa en humanos, que reflejan en gran medida los efectos observados en los modelos animales. Las primeras mutaciones en el gen de la glucokinasa asociadas a enfermedad se describieron en 1992 (47, 48), desde entonces se han identificado casi 700 mutaciones en el gen *GCK* en todo el mundo (49). Mutaciones que inactivan a la glucokinasa causan hiperglucemia familiar o MODY2 (*Maturity-Onset Diabetes of the Young type 2*; OMIM# 125851) cuando se presentan en heterocigosis y diabetes neonatal permanente (PNDM-GCK; OMIM# 606176) cuando se encuentran en homocigosis o en doble heterocigosis. Por el contrario, mutaciones activadoras causan hipoglucemia hiperinsulinémica (HH-GCK; OMIM# 602485) (50).

- Hiperglucemia familiar o MODY2. El término MODY (*Maturity-onset diabetes of the Young*) hace referencia a un conjunto heterogéneo de diabetes monogénicas caracterizadas por una aparición temprana, generalmente antes de los 25 años y que presentan un patrón de herencia autosómico y dominante (51, 52). Hasta la fecha, se han identificado al menos 13 *loci* asociados a distintos subtipos de MODY (53). El subtipo MODY2, causado por mutaciones inactivantes en uno de los alelos del gen *GCK* es uno de los subtipos de MODY más frecuentes (54). Se ha estimado que la prevalencia de MODY2 en la población europea es de 1,1 de cada 1000 individuos, aunque este dato podría estar infravalorado debido a que la falta de diagnóstico genético puede resultar en el diagnóstico erróneo de estos individuos como diabéticos Tipo 1 o, en la mayor parte de los casos, Tipo 2 (55).

Los pacientes MODY2, se caracterizan por presentar una leve hiperglucemia en ayunas, con valores entre 5,5 y 8,3 mM (referencia < 5,5 mM) y HbA_{1c} entre 5,8 y 7,6% (referencia < 5,7%) (56). Aunque la hiperglucemia puede detectarse desde el nacimiento, frecuentemente el diagnóstico se realiza a edades más avanzadas debido a la escasa sintomatología que, salvo en raras ocasiones, no se deteriora con la edad (57-59). Estos pacientes no suelen desarrollar otras complicaciones clínicas típicas de la diabetes (55), y generalmente tampoco requieren tratamiento farmacológico (60).

Debido a que la glucokinasa actúa como sensor de glucosa en las células β pancreáticas, la inactivación parcial de la enzima causa un aumento del umbral de glucosa para la secreción de insulina por encima de lo normal (5 mM). De esta manera, el control de la glucemia se realiza a unos niveles de glucosa circulantes ligeramente superiores, causando la hiperglucemia típica de estos pacientes (23). Además, se ha observado que los pacientes MODY2 suelen presentar bajo peso al nacer, cuando la madre no porta la mutación. Por el contrario, los hijos no portadores de madres MODY2 suelen presentar mayor peso al nacimiento que la media de la población, indicando los efectos de las mutaciones sobre la secreción de insulina y la influencia de ésta sobre el crecimiento fetal (revisado en (55)). Por otra parte, debido a la función de la glucokinasa en los hepatocitos, los individuos MODY2 muestran una síntesis de glucógeno defectiva y mayor tasa de gluconeogénesis tras la ingesta (61).

- Diabetes Mellitus Neonatal Permanente (PNDM) asociada a mutaciones en la glucokinasa. La diabetes neonatal se define como una hiperglucemia insulín dependiente que se manifiesta desde los primeros meses de vida y que afecta a 1 de cada 400.000 nacidos, de los cuales la mitad remite espontáneamente (Diabetes

Mellitus Neonatal Transitoria; TNDM), mientras que el resto es permanente (62). La PNDM está causada por mutaciones en genes que juegan un papel central en el desarrollo, la supervivencia y la función de las células β pancreáticas (63). Las principales causas de PNDM son mutaciones activadoras en los genes *KCNJ11* y *ABCC8* que codifican para los canales de K^+ dependientes de ATP y mutaciones inactivantes del gen de la insulina (revisado en (64)).

La diabetes neonatal permanente causada por mutaciones en el gen *GCK* (PNDM-GCK) es muy poco frecuente y ocurre cuando los dos alelos del gen *GCK* portan mutaciones que inactivan a la enzima (65). Las características clínicas de los pacientes afectados por PNDM-GCK suelen ser retraso del desarrollo intrauterino, bajo peso al nacer y grave hiperglucemia que, en ocasiones, va asociada a cetoacidosis desde los primeros días de vida (66, 67). Estos pacientes requieren tratamiento con insulina y en algunas ocasiones el uso de sulfonilureas permite mejorar el control de la glucemia (66).

- Hipoglucemia hiperinsulinémica (HH) debida a mutaciones en la glucokinasa. El hiperinsulinismo congénito es una entidad clínica heterogénea, tanto en la edad de comienzo como en la severidad y en la respuesta a la medicación (68). No obstante en todos los casos la causa de la hipoglucemia es una desregulación en la secreción de insulina (69, 70). Es importante el diagnóstico temprano de la enfermedad, puesto que la hipoglucemia continua y recurrente puede ocasionar daños cerebrales irreversibles. En aproximadamente la mitad de los casos descritos, la causa genética de la enfermedad es desconocida, en el resto de los casos una gran proporción (40 - 45%) se deben a mutaciones inactivantes en los genes que codifican para los canales de K^+ dependientes de ATP (revisado en (71)).

La hipoglucemia hiperinsulinémica causada por mutaciones en el gen *GCK* (HH-GCK) es muy poco frecuente (aproximadamente el 1% de los casos de HH) (72) y se debe a mutaciones activadoras con un patrón de herencia autosómico y dominante. La base fisiopatológica de la HH-GCK es que el aumento de actividad glucokinasa disminuye el umbral de glucosa para la secreción de insulina, dando lugar a una hipersecreción de insulina incluso en condiciones de hipoglucemia. Los pacientes con HH-GCK suelen ser tratados mediante comidas frecuentes y/o con diazóxido, que mantiene abiertos los canales de K⁺ dependientes de ATP (73). Sin embargo, en casos más graves ha sido necesaria realizar una pancreatectomía parcial, observándose tras un examen histológico que, el páncreas mostraba ciertas anormalidades como islotes de mayor tamaño e incremento de la proliferación de las células β (revisado en (50)).

2. Biología molecular de la glucokinasa.

El papel fundamental de la glucokinasa en la regulación de la homeostasis de glucosa se debe a sus características diferenciales, tanto cinéticas como reguladoras. La baja afinidad por glucosa y el comportamiento sigmoideo en la curva de saturación por este sustrato, con un punto de inflexión próximo a los niveles de glucemia basal, permiten una actividad óptima de la enzima en el rango fisiológico de concentración de glucosa (12) (Figura 1B). La cooperatividad respecto a la glucosa, característica de la cinética enzimática de la glucokinasa, se explica en base a su modelo estructural y a los cambios conformacionales que se producen durante la catálisis.

2.1. Estructura de la glucokinasa, modelo cinético y cooperatividad por glucosa.

Los modelos clásicos propuestos para explicar la cooperatividad asumen la existencia de varias subunidades o bien de varios centros activos, por lo que no son válidos para comprender la cinética enzimática de la glucokinasa, que actúa en forma monomérica y presenta un único centro activo (74, 75). Los estudios estructurales realizados por Kamata y colaboradores (76) pusieron de manifiesto que la glucokinasa presenta una estructura bipartita con un dominio mayor y otro menor unidos por una región bisagra que contiene tres bucles conectores. El primero de ellos, según estos estudios, cubre los residuos de aminoácido 64 a 72 y es mucho más grande y flexible que en las demás hexoquinasas, suponiendo esto una característica diferencial con consecuencias conformacionales. También pusieron de manifiesto la existencia de una conformación super-abierta en ausencia de glucosa y cualquier otro ligando y una conformación cerrada en presencia de glucosa unida al centro activo y del GKA MRK (2-

amino-4-fluoro5-[(1-metil-1H-imidazol-2-YL)sulfanil]-N-(1,3-tiazol-2-YL)benzamida),
unido al sitio alostérico (Figuras 4A y 4B) (76). Estudios posteriores han demostrado la
existencia de otras conformaciones intermedias, entre las que se incluyen la
conformación abierta, equivalente al estado abierto de la hexokinasa I (77-79), y han
permitido redefinir algunos aspectos estructurales tales como el primer bucle conector,
que según los últimos estudios cubre los residuos de aminoácido 47 a 71 (80).

En la conformación cerrada, la glucokinasa forma una hendidura en la que se
encuentra el sitio de unión de la glucosa que interacciona tanto con residuos del dominio
mayor (Glu256, Glu290), como del menor (Thr168, Lys169) y del segundo bucle conector
(Asn204, Asp205), que forma parte de la región bisagra (76). Debido a que el primer bucle
conector es más largo y flexible, en ausencia de glucosa y otros ligandos, la glucokinasa
adopta una conformación más abierta de la que puede adoptar la hexokinasa I, por lo
que se ha denominado conformación super-abierta. En esta conformación la glucokinasa
tiene baja afinidad por glucosa, debido a que los residuos del dominio menor implicados
en la interacción con el sustrato se encuentran alejados del sitio de unión. Este estado
super-abierto resulta en que los cambios conformacionales necesarios para adoptar la
conformación cerrada sean mucho mayores que los observados para la hexokinasa I.
Además de producirse un acercamiento de ambos dominios y una rotación de 99° entre
ellos, se producen múltiples reordenamientos estructurales, sobre todo en el dominio
menor (Figura 4C). La hélice α -13 se libera del dominio menor y un bucle que cubre los
residuos 151 a 180, que se encuentra desorganizado en la conformación super-abierta,
se estructura en forma de lámina β en la conformación cerrada (Figura 4A) (revisado en
(81)). El sitio alostérico, originado en la conformación cerrada está situado en la región

bisagra e incluye a residuos de ambos dominios dentro de la lámina β -1, las hélices α -5 y α -13 y del primer bucle conector (76).

La cooperatividad por glucosa ha sido explicada por dos modelos, el modelo mnemónico y el modelo de transición lenta inducida por ligando (79). Ambos modelos atribuyen la cooperatividad a que los cambios conformacionales inducidos por la glucosa son mucho más lentos que los que se dan durante la catálisis. A baja concentración de glucosa, la glucokinasa se encuentra principalmente en su conformación super-abierta, de baja afinidad. Con la unión de glucosa, la enzima sufre un cambio conformacional lento, pasando por múltiples estados intermedios, a la forma cerrada, la cual une ATP y cataliza la reacción. Tras liberar los productos, si la concentración de glucosa es baja, la proteína se relaja lentamente hasta la conformación super-abierta. Si por el contrario, la concentración de glucosa es elevada, se unen nuevas moléculas de sustrato, permaneciendo la enzima en el estado de alta afinidad (Figura 5) (76, 77, 78).

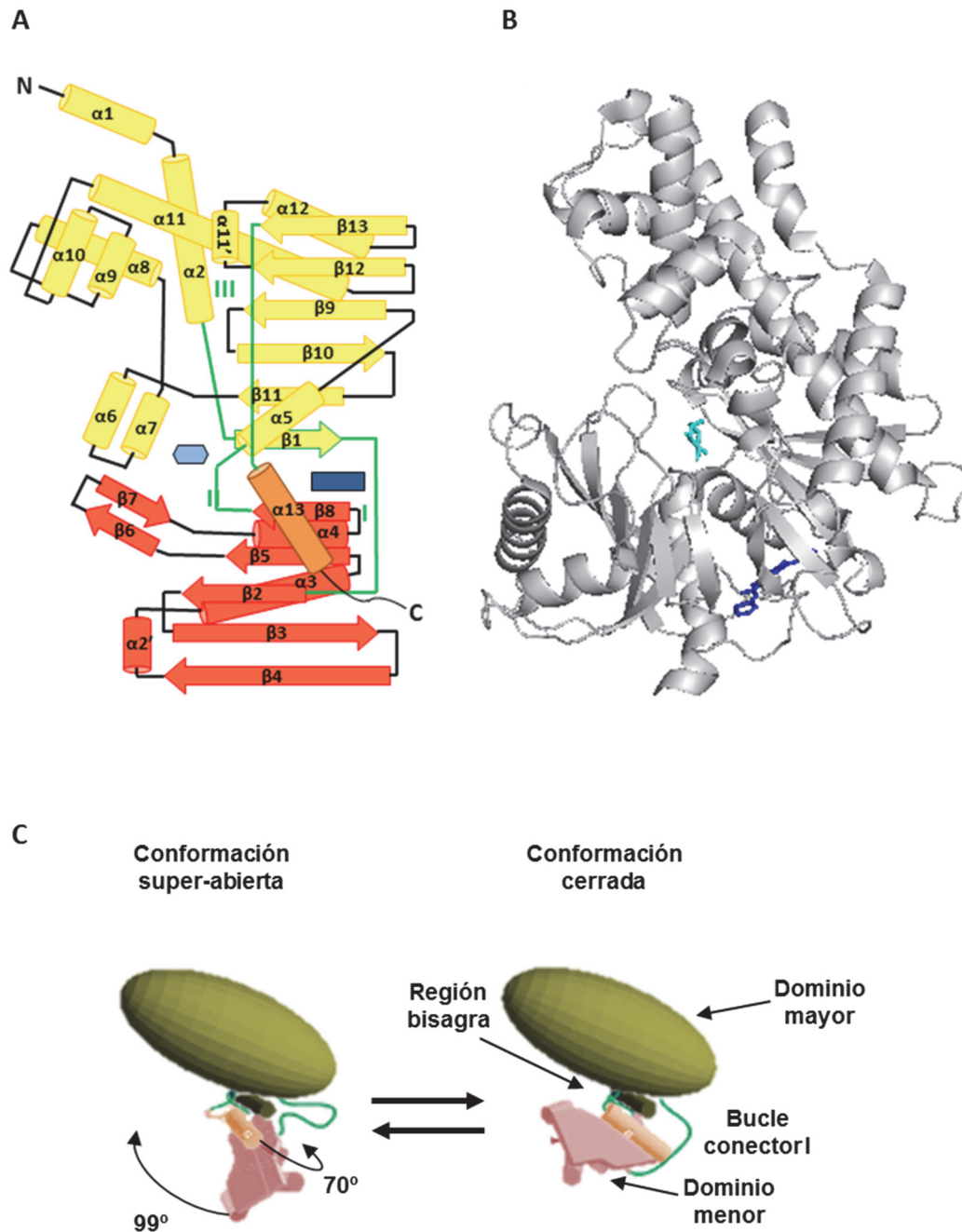


Figura 4. Representación esquemática de la estructura proteica de la glucokinasa.

A) Se muestra la ordenación de las estructuras secundarias de la glucokinasa en presencia de glucosa (hexágono azul claro) y el GKA MRK (rectángulo azul oscuro). La glucokinasa está constituida por un dominio mayor (amarillo) y un dominio menor (rojo). Las regiones conectoras I a III según (80) se muestran con línea verde. La hélice α -13 (naranja) del extremo C-terminal forma parte del dominio menor de la enzima en la conformación cerrada. B) La estructura proteica de la glucokinasa en conformación cerrada (PDB código IV4S) se ha representado utilizando el programa *PyMOL*. La glucokinasa se ha representado en gris unida a glucosa (azul claro) y al GKA MRK (azul oscuro). C) Se muestran las conformaciones super-abierta y cerrada de la glucokinasa y se indican los cambios conformacionales más significativos que acontecen en el paso de una a otra. Imágenes adaptadas de (76).

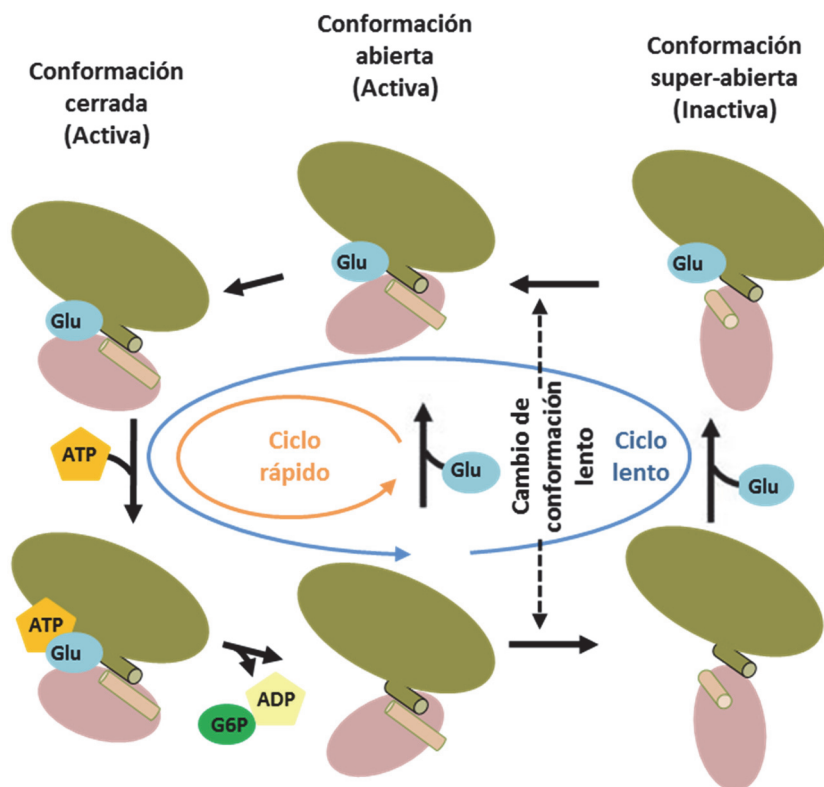


Figura 5. Modelo cinético de la glucokinasa. Se muestran tres conformaciones diferentes (cerrada, abierta y super-abierta) sobre las que se basa el modelo cinético y los dos posibles ciclos catalíticos que pueden darse (rápido y lento). La relación entre los dos ciclos es responsable de la cooperatividad por glucosa. El ciclo lento es aquel que comienza con la unión de la glucosa a la forma super-abierta inactiva de la enzima, y el ciclo rápido en el que se une a la conformación abierta activa, similar a la hexokinasa I. Imagen adaptada de (76).

2.2. Regulación de la actividad glucokinasa.

La regulación de la glucokinasa se produce tanto a nivel de expresión génica como a nivel postraduccional, existiendo diferencias importantes a ambos niveles entre distintos tipos celulares.

2.2.1. Regulación de la expresión génica.

El gen *GCK* humano está compuesto por 12 exones y se transcribe a partir de dos promotores alternativos, distanciados por aproximadamente 30 Kb. El promotor proximal es activo en el hígado, mientras que el distal regula la transcripción de la enzima en células del eje neuroendocrino. De esta manera existe una regulación de la expresión de la glucokinasa diferente en hepatocitos y células neuroendocrinas. El promotor distal permite la transcripción de los exones 1a y 2 a 10, mientras que el promotor proximal lo hace de los exones 1b, 1c y 2 a 10, de manera que existen dos isoformas de la glucokinasa, la neuroendocrina y la hepática, que difieren en los 15 primeros aminoácidos de los 465 que constituyen la proteína, sin que ello cause diferencias en las características cinéticas (Figura 6) (23, 82). Clásicamente se ha considerado que la expresión de la glucokinasa a partir del promotor neuroendocrino se da de forma constitutiva y que la regulación de la actividad glucokinasa en estas células se produce principalmente a nivel postranscripcional y/o postraduccional (83, 84). No obstante, se ha descrito que la expresión de la glucokinasa en las células del eje neuroendocrino podría estar modulada por insulina, de tal manera que a nivel pancreático esta hormona estaría actuando de forma autocrina (85). Además, existen evidencias de que la transcripción de la glucokinasa a partir del promotor neuroendocrino podría estar

regulada por otros factores como el AMP cíclico (AMPc) generado por la vía de señalización del glucagón (86).

La expresión génica de la glucokinasa en hepatocitos se encuentra principalmente regulada por la acción hormonal, siendo la insulina el principal factor estimulador. En ayuno y en situaciones de deficiencia de insulina, como en la diabetes tipo I, la expresión de la glucokinasa hepática se mantiene muy baja, pero se incrementa tras la ingesta o el tratamiento con insulina (23). La acción estimuladora de la insulina sobre la transcripción del gen de la glucokinasa es contrarrestada por glucagón, análogos del AMPc y altas concentraciones de glucosa, mientras que otras hormonas como los glucocorticoides y la hormona tiroidea tienen efectos permisivos sobre la inducción (Revisado en (81)). La activación transcripcional del gen *GCK* ocurre a través de las dos principales vías de señalización de la insulina, la vía de la 3-fosfoinosítido kinasa (PI3K)/ proteína kinasa B (PKB) y la vía de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKinasas). Ambas vías parecen regular la acción de los múltiples factores de transcripción que, según se ha descrito, son capaces de unirse al promotor hepático del gen *GCK*, incluyendo al factor nuclear hepatocítico 4 α (HNF 4 α), el factor 1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α), el receptor activador de la proliferación de peroxisomas γ (PPAR- γ) y la isoforma 1c de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP-1c) entre otros (Revisado en(81)).

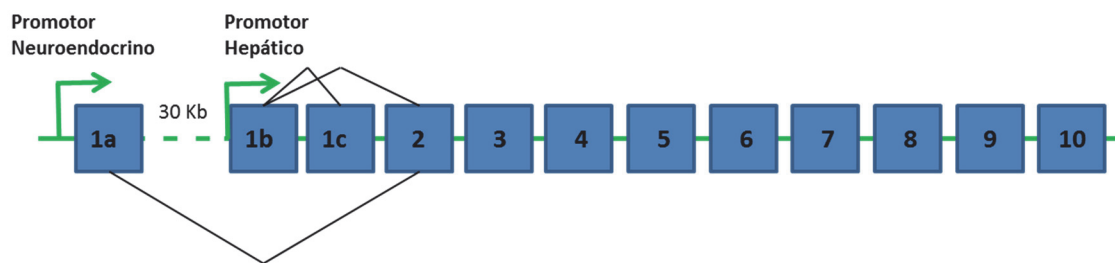


Figura 6. Representación esquemática del gen *GCK*. Se muestra un esquema de la región cromosómica que cubre las posiciones hg38 chr7: 44.144.275 -44.189.423, que se corresponde con 45,15 Kb de la hebra – en la banda 13 del brazo corto del cromosoma 7 (7p13) y que codifica para la glucokinasa. Los exones se muestran como rectángulos azules numerados separados por intrones, representados como líneas. Se han representado los promotores distal (neuroendocrino) y proximal (hepático) como flechas verdes. Los exones 1a y 2 a 10 codifican para la forma neuroendocrina de la glucokinasa mientras que los exones 1b y 2 a 10 codifican para la isoforma L1 mayoritariamente hepática, mientras que los exones 1b, 1c y 2 a 10 codifican para una forma minoritaria hepática (82).

2.2.2. Regulación postranscripcional de la actividad glucokinasa.

Los mecanismos de regulación postraducciona l de la actividad glucokinasa incluyen modificaciones covalentes e interacciones con otras proteínas y con metabolitos (81). Uno de los principales mecanismos que regulan la actividad de la enzima en todos los tejidos es la concentración de glucosa. Debido a la curva de actividad sigmoidea, los niveles de este sustrato controlan finamente la actividad glucokinasa. Además, la unión de glucosa a la enzima produce la estabilización de la proteína, e incluso se ha sugerido que este azúcar podría estabilizar su mRNA frente a la degradación (83, 84, 87, 88).

Aunque *in vitro* se han descrito distintas modificaciones covalentes, no está claro el efecto que estas tienen *in vivo*, y en algunos de los casos se desconoce si estas modificaciones se producen fisiológicamente. La fosforilación de proteínas mediada por la kinasa dependiente de AMPc (PKA) es uno de los principales mecanismos efectores por los cuales disminuye la tasa glucolítica en respuesta a glucagón (89, 90). A pesar de que la glucokinasa es fosforilada *in vitro* por la PKA produciendo una disminución de la actividad enzimática, se desconoce si fisiológicamente esta fosforilación inhibe a la glucokinasa en respuesta a glucagón (91-93).

Los residuos de cisteína de la glucokinasa son susceptibles de oxidación o nitrosilación. En ausencia de agentes reductores, los residuos de cisteína próximos al centro activo se pueden oxidar formando puentes disulfuro que impiden los cambios conformacionales que se dan durante la catálisis (94). Además, se ha descrito que en la célula β , los residuos de cisteína (C364 y C371) pueden ser modificados de forma

reversible por la óxido nítrico sintasa mediante un proceso denominado S-nitrosilación (95).

En general, la modificación postraduccional mediante la unión covalente de las proteínas ubiquitina o SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) a residuos de lisina, regula múltiples procesos celulares como interacciones proteína-proteína, localización celular y estabilidad proteica (96). Se ha descrito que la glucokinasa, en especial la isoforma pancreática, puede ser modificada covalentemente *in vitro* mediante ubiquitinación y sumoilación (97-99). Experimentos *in vitro* pusieron de manifiesto que la ubiquitina es capaz de activar alostéricamente a la glucokinasa y que puede unirse covalentemente a múltiples lisinas de esta, por acción de una ubiquitina ligasa (97). Posteriormente, experimentos realizados en cultivos celulares mostraron que la inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma, a la par que aumenta la cantidad de glucokinasa en la célula, produce la inclusión de esta en agresomas (98). Por lo tanto parece que la ubiquitina podría regular tanto la actividad como la estabilidad de la glucokinasa.

Como ya se ha mencionado, los quince primeros aminoácidos varían entre las formas pancreática y hepática de la glucokinasa, aunque este hecho no suponga ninguna diferencia en la cinética enzimática, puede constituir un punto de regulación diferencial puesto que, en la isoforma neuroendocrina la Lys12 forma parte de una secuencia susceptible de ser modificada por sumoilación. Experimentalmente se ha observado que, en la glucokinasa pancreática las lisinas que ocupan las posiciones 12 y 346 (este último compartido con la isoforma hepática) pueden ser sumoiladas por la enzima Ubc9, aumentando la actividad enzimática así como su estabilidad (99).

La actividad glucokinasa también puede verse sometida a regulación alostérica. Los acil-CoAs de cadena larga como el palmitoil-CoA, son potentes inhibidores alostéricos (100, 101). En hepatocitos se ha observado un efecto inhibitorio de la fosforilación de glucosa en presencia de palmitato, lo que sugiere que la actividad glucokinasa podría ser inhibida de manera fisiológica a altas concentraciones de ácidos grasos (101). Por otro lado, el descubrimiento de que los GKAs se unen al sitio alostérico, pone de manifiesto que es posible la existencia de metabolitos que pudieran actuar como activadores alostéricos fisiológicos, aunque aún no se haya identificado ninguno (102).

2.2.3. Regulación de la glucokinasa por interacción con otras proteínas celulares.

La glucokinasa puede interaccionar con otras proteínas celulares afectando a su actividad enzimática, su estabilidad proteica y su localización subcelular. Entre estas se encuentran la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (95), la proteína proapoptótica de la familia de Bcl-2, BAD (103), la enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-kinasa-2,6-bisfosfatasa (PFK2-Pasa) (104) y la proteína reguladora de la glucokinasa (GKRP) (105).

La glucokinasa, a través de su interacción con la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (nNOS), puede asociarse a los gránulos de insulina en las células β pancreáticas. Esta asociación, que ocurre a baja concentración de glucosa, limita la actividad de la enzima (95, 106, 107). La activación de nNOS por calcio e insulina resulta en la nitrosilación de la Cys371 de la glucokinasa y la liberación de la enzima activa al citoplasma (95, 108, 109).

BAD (*Bcl-2-associated death promoter*) es una proteína con un papel central en el proceso de apoptosis que interacciona con la glucokinasa, dentro de un complejo multiproteico asociado a la membrana mitocondrial, tanto en células β como en hepatocitos (103). La fosforilación de BAD en su dominio BH3 promueve su interacción con la glucokinasa activando a la enzima (110). La activación ocurre por la unión del dominio BH3 de BAD al dominio menor de la glucokinasa, facilitando los cambios conformacionales necesarios para la catálisis. Así la unión de BAD produce un incremento de la V_{max} sin alterar la afinidad ni la cooperatividad por glucosa (111). Se ha observado que, hepatocitos con deficiencia de BAD presentan una disminución de la glucólisis y la oxidación mitocondrial y un aumento de la gluconeogénesis (112, 113). En células β pancreáticas la interacción de BAD con la glucokinasa potencia la secreción de insulina y la supervivencia celular, contribuyendo a mantener la masa de células productoras de insulina (110, 114).

La enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-kinasa-2,6-bisfosfatasa (PFK2-Pasa) cataliza la formación y degradación de fructosa 2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂), uno de los principales activadores del flujo glucolítico e inhibidor del gluconeogénico (115, 116). La síntesis de Fru-2,6-P₂ tiene lugar a partir de fructosa 6-fosfato y ATP gracias a la actividad kinasa de la enzima (PFK2) y la degradación de Fru-2,6-P₂ es catalizada por su actividad fosfatasa (Pasa) (115-117). Tanto en células β como en hepatocitos, cuando las concentraciones de glucosa son elevadas, la PFK2-Pasa a través del dominio fosfatasa toma contacto con la glucokinasa activándola de manera similar a como lo hace BAD (104, 118, 119). Además, se ha observado un aumento de glucokinasa cuando se coexpresa la enzima bifuncional en hepatocitos, sugiriendo que la PFK2-Pasa protege a la glucokinasa frente a la degradación (81, 120).

2.2.4. Proteína reguladora de la glucokinasa y regulación de la distribución núcleo-citoplasmica de la enzima.

La proteína reguladora de la glucokinasa interacciona con la glucokinasa inhibiendo a la enzima y regulando su localización núcleo-citoplásmica en los hepatocitos (revisado en (23, 121)). La importancia fisiológica de la regulación de la glucokinasa hepática por la GGRP es bien conocida. Sin embargo, no lo es tanto en otros tejidos que expresan GGRP como el hipotálamo (122, 123). En cuanto a la célula β pancreática, la expresión de GGRP es demasiado baja, por lo que sería insuficiente para regular la glucokinasa expresada en estas células (124). De hecho, no se ha descrito la presencia de glucokinasa en el núcleo de las células β pancreáticas.

La GGRP fue descubierta en 1989 por *Van Schaftingen* y permitió descifrar dos grandes incógnitas que sugerían la existencia de algún mecanismo inhibitorio de la glucokinasa en el hígado (125). La primera era que la tasa de fosforilación de glucosa era mayor al utilizar glucokinasa purificada que la observada en hepatocitos, y la segunda que la tasa de fosforilación de glucosa en las células hepáticas era fuertemente estimulada a concentraciones micromolares de fructosa (126, 127). Ambas observaciones son atribuibles a la inhibición de la glucokinasa por GGRP en los hepatocitos. La GGRP inhibe la actividad glucokinasa disminuyendo su afinidad por glucosa, pero no actúa sobre otras hexoquinas (105). Además, la afinidad de la GGRP por la glucokinasa es superior a la que presenta cualquiera de las demás proteínas que se unen a esta enzima (81). La unión máxima de glucokinasa a GGRP ocurre a baja concentración de glucosa, la cual favorece la conformación super-abierta inactiva de la enzima (76, 105). La afinidad de la GGRP para su unión a la glucokinasa se ve potenciada

por fructosa 6-fosfato (F6P) y disminuida por fructosa 1-fosfato (F1P) y fosfato inorgánico (105). Los efectos contrarios de F1P y F6P son debidos a que ambos metabolitos compiten por el mismo sitio de unión en la GKR, estabilizando dos conformaciones distintas. La conformación estabilizada por F6P es la que exhibe alta afinidad de unión a la glucocinasa (128-131). El sentido fisiológico de esta regulación es que tras la ingesta la fructosa absorbida es fosforilada por la fructocinasa hepática produciendo F1P, que al unirse a la GKR facilita la liberación de la glucocinasa activa para fosforilar glucosa. El efecto de la F6P podría suponer un mecanismo indirecto de retroinhibición de la actividad glucocinasa, puesto que debido a la acción de la fosfo-hexosa-isomerasa, la F6P se encuentra en equilibrio con la G6P (132).

La GKR es una proteína de 68 KDa cuyo gen ha evolucionado desde una familia de genes ancestrales procariotas que codificaban para proteínas con dominios isomerasa de azúcares (SIS) (133). Recientemente la GKR humana ha sido cristalizada en dos conformaciones, la de mayor afinidad por glucocinasa, unida a sorbitol 6-fosfato (S6P; análogo que mimetiza los efectos de la F6P) (134), y la de menor afinidad por la enzima, unida a F1P o fosfato inorgánico (135). Se han descrito tres dominios en la estructura de la GKR, dos dominios SIS en la mitad N-terminal de la proteína (SIS-1, residuos 45 a 284 y SIS-2, residuos 289 a 498), coronados por el dominio α helicoidal C-terminal (dominio tapa) y los residuos 6 a 44 del extremo N-terminal. El S6P, o alternatively la F1P, se unen a la misma cavidad cerca del dominio SIS-1, modificando la conformación del dominio de unión a la glucocinasa (Figuras 7A y 7B) (134, 135).

Identificar los dominios de contacto de la glucokinasa con la GKRP ha sido objeto de estudio durante años. Inicialmente se propuso un modelo en el cual residuos localizados en el dominio menor y la región bisagra estarían implicados en la interacción con la GKRP (136). Otro estudio en el que se analizaba la interacción entre la GKRP con quimeras GCK-HXK2 mostró la necesidad de la secuencia comprendida entre los residuos 1 a 368 de la glucokinasa para la interacción con GKRP, no siendo aparentemente necesarios los últimos 100 residuos del extremo C-terminal (137). Posteriormente se postuló la existencia de motivos consenso de unión, que incluían residuos de leucina y asparagina, distribuidos en distintas áreas de la glucokinasa (138). Más recientemente se ha propuesto el centro alostérico como sitio de unión alternativo para GKAs o GKRP (139-141). Finalmente en 2013 se han cristalizado los complejos GCK-GKRP-F6P, de *Xenopus laevis* (130) y de mamífero (GCK humana y GKRP de rata) (131). En ambos casos se ha demostrado que la interacción de la GKRP unida a F6P se da con la conformación superabierta inactiva de la glucokinasa, principalmente a través de interacciones hidrofóbicas y unos pocos contactos polares. Las superficies de interacción incluyen residuos del dominio SIS-2 de la GKRP y la región bisagra de la glucokinasa, junto a unos pocos residuos del dominio mayor y algunos más del dominio menor de la enzima (Figuras 7C y 7D) (130, 131).

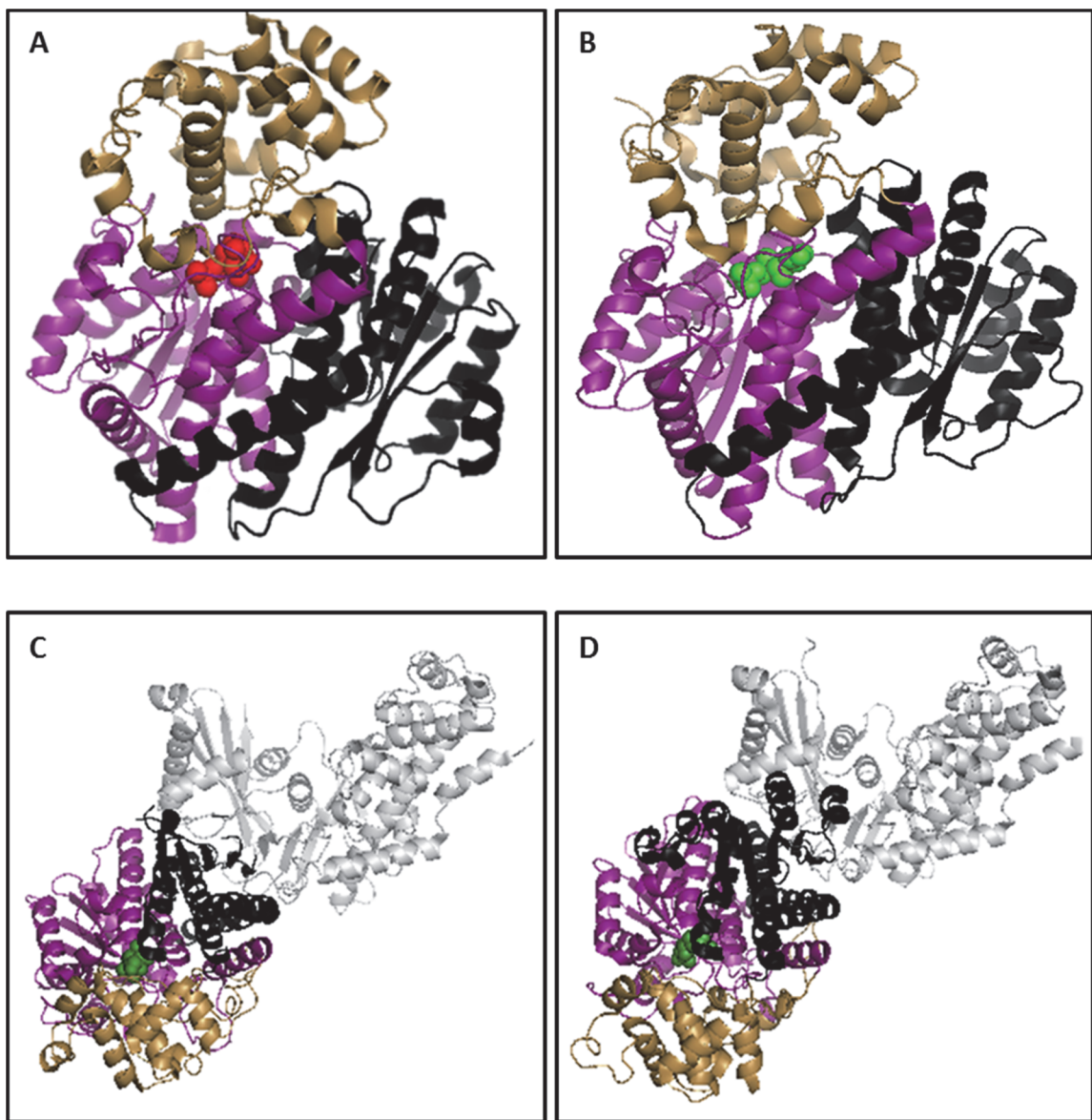


Figura 7. Modelo estructural de la GKR humana y de los heterodímeros GCK-GKR de *Xenopus laevis* y de mamífero. Las estructuras proteicas (PDB códigos 4BB9, GKR unida a F1P, 4LY9, GKR unida a S6P, 4LC9, heterodímero GCK-GKR de mamíferos y 3WOL, heterodímero GCK-GKR de *Xenopus laevis*) se han representado utilizando el programa PyMOL. A) Modelo estructural de la GKR humana unida a F1P, se muestran los dominios SIS-1 en morado, SIS-2 en negro y el dominio tapa en marrón. Además se muestra en rojo la molécula de F1P. Adaptado de (135). B) Modelo estructural de la GKR humana unida a S6P, se muestran los dominios SIS-1 en morado, SIS-2 en negro y el dominio tapa en marrón. Además se muestra en verde la molécula de S6P. Adaptado de (134). C) Modelo estructural del heterodímero formado por la GCK humana y la GKR de rata, se muestran los dominios SIS-1, SIS-2 y tapa utilizando el mismo código de colores que en A y B, además de la estructura de la GCK (gris) en su conformación super-abierta. Adaptado de (131). D) Modelo estructural del heterodímero GCK-GKR de *Xenopus laevis*, se muestran los dominios SIS-1, SIS-2 y tapa utilizando el mismo código de colores que en A, B y C, además de la GCK (gris) en su conformación super-abierta. Adaptado de (130). En C y D la GKR se encuentra unida a F6P que se ha representado en verde oscuro.

La GKRП además de actuar como inhibidor de la actividad glucocinasa, regula la localización núcleo citoplásmica de la enzima. La GKRП se encuentra predominantemente, pero no de manera exclusiva, en el núcleo de los hepatocitos (142-144). Cuando la glucocinasa se encuentra en su conformación super-abierta inactiva debido a bajas concentraciones de glucosa (≤ 5 mM), como ocurre en el ayuno, es secuestrada en el núcleo unida a la GKRП (137). Sin embargo, cuando aumentan los niveles de glucosa o de precursores de F1P, la glucocinasa es detectada en el citoplasma (144-147). Así pues, la localización núcleo-citoplásmica de la GCK depende del estado metabólico, a diferencia de la GKRП (142, 143, 145, 148). La presencia de glucocinasa en el núcleo es dependiente de la presencia de GKRП ya que, tanto en hepatocitos de ratones en los que se inactivó el gen de la GKRП (*gckr* -/-), como en líneas celulares transfectadas con glucocinasa pero sin GKRП, la glucocinasa se encuentra exclusivamente en el citoplasma (137, 144, 145, 147, 149).

La inhibición causada por la unión de la GKRП a la glucocinasa y su importación al núcleo, además de prevenir un ciclo fútil de fosforilación y defosforilación de glucosa en condiciones gluconeogénicas, constituye un mecanismo de protección de la enzima frente a la degradación durante los periodos de ayuno, permitiendo mantener una reserva útil de glucocinasa necesaria para afrontar los rápidos aumentos de glucemia que se dan tras la ingesta, como sugiere el hecho de que en ratones deficientes de GKRП (*gckr* -/-) la cantidad basal de GCK está reducida un 50%. Un efecto similar se ha observado en líneas celulares transfectadas con glucocinasa con o sin GKRП (132, 144, 145, 147).

Se han identificado mutaciones que afectan a la GKR_P humana (124, 149-152). La variante más común de GKR_P, P446L, se asocia a un aumento de triglicéridos en sangre e hígado, valores reducidos de glucemia en ayunas y menor resistencia a la insulina (153-155). Estudios cinéticos y celulares para analizar el efecto de la mutación GKR_P(P446L) mostraron una disminución de la interacción GCK-GKR_P dependiente de F6P, dando lugar a mayor actividad glucokinasa y menor acumulación de la enzima en el núcleo (124, 150, 151).

La translocación núcleo-citoplásmica de la glucokinasa está regulada por metabolitos y hormonas (revisado en (81)). Los estímulos fisiológicos más importantes en la translocación de la glucokinasa desde el núcleo al citoplasma son la elevación de la concentración de glucosa por encima de 5 mM y concentraciones micromolares de fructosa (156). El proceso de exportación nuclear es más rápido que el de entrada al núcleo y es consistente con un modelo en el que la glucokinasa, al ser activada por su unión a glucosa, cambia a su conformación cerrada, se disocia de la GKR_P en el núcleo y es exportada independientemente de GKR_P al citoplasma (Figura 8) (137, 157, 158). Se ha propuesto que la enzima exportada del núcleo se acumula en el citoplasma del hepatocito donde puede asociarse a la enzima bifuncional PFK2-Pasa (159). La relación insulina/glucagón también regula la translocación núcleo-citoplasma de la glucokinasa. Se ha descrito que, en presencia de elevadas concentraciones de glucosa, el glucagón induce la disociación de la glucokinasa con la PFK2-Pasa y potencia su translocación al núcleo (159). Por lo tanto es posible que en el estado diabético, el glucagón induzca el secuestro de la glucokinasa al núcleo, contribuyendo a aumentar la producción de glucosa y disminuir su captación por los hepatocitos (81).

El mecanismo molecular para la exportación de la glucokinasa no está del todo esclarecido. Se ha propuesto que la salida de la enzima del núcleo, una vez disociado el complejo que forma con la GKRP, es posible gracias a una señal de exportación nuclear localizada en el dominio mayor y que está contenida entre los residuos de aminoácido 300 a 310 de la glucokinasa (137).

El transporte núcleo-citoplásmico de proteínas ocurre a través del complejo del poro nuclear (NPC), cuyo tamaño límite de exclusión es de 40 KDa (160). De tal manera que proteínas que superen dicho tamaño son transportadas con gasto de energía a través del NPC siempre y cuando posean secuencias de localización nuclear (NLS) o secuencias de exportación nuclear (NES) reconocibles por las karioferinas (161, 162). La exportación nuclear está mediada por la formación de complejos de exportación, donde las exportinas actúan como receptores de las proteínas cargo mediante el reconocimiento de secuencias NES (163). La exportina 1, también denominada CRM1 (Región de mantenimiento cromosómico 1), es la que posee un mayor rango de sustratos conocidos, incluyendo la hexokinasa 2 de levadura (161, 162, 164). La unión y liberación de la proteína cargo a la exportina está controlada por la proteína GTPasa Ran y por otras proteínas asociadas que actúan de cofactores (163, 165). En el núcleo se forma un complejo heterotrimérico compuesto por la exportina 1, la proteína cargo y Ran unida a GTP (RanGTP), la translocación a través del NPC ocurre mediante interacciones del complejo con varias nucleoporinas tales como Nup214 y Nup358/RanBP2. En el citoplasma, las proteínas de unión a Ran (RanBP1 y RanBP2) estimulan la actividad GTPasa de Ran a través de RanGAP. La hidrólisis del GTP da lugar a RanGDP y promueve la disociación del complejo de exportación, liberando la proteína cargo en el citoplasma (Revisado en (163)) (Figura 9A).

Las NES reconocidas por la exportina 1/CRM1 son secuencias de 10 a 15 aminoácidos que contienen residuos hidrofóbicos regularmente espaciados que, generalmente, se ajustan al consenso clásico ϕ -X(2,3)- ϕ -X(2,3)- ϕ -X- ϕ , donde ϕ es un aminoácido hidrofóbico (principalmente leucina, aunque también puede ser Ile, Met, Val o Phe) y X puede ser cualquier aminoácido (166). En realidad, se ha descrito que la exportina 1/CRM1 puede reconocer al menos seis patrones distintos de NES, diferenciados por el número y naturaleza de los residuos espaciadores entre los hidrofóbicos, dando lugar a seis tipos de NES con diferente capacidad exportadora (Figura 9B) (167). De acuerdo con esto, la secuencia 300_ELVRLVLLRLV_310 de la glucokinasa constituye una NES de clase 1b (ϕ -X-X- ϕ -X-X- ϕ -X- ϕ). Datos previos de nuestro laboratorio han confirmado la función NES de esta secuencia (García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168)).

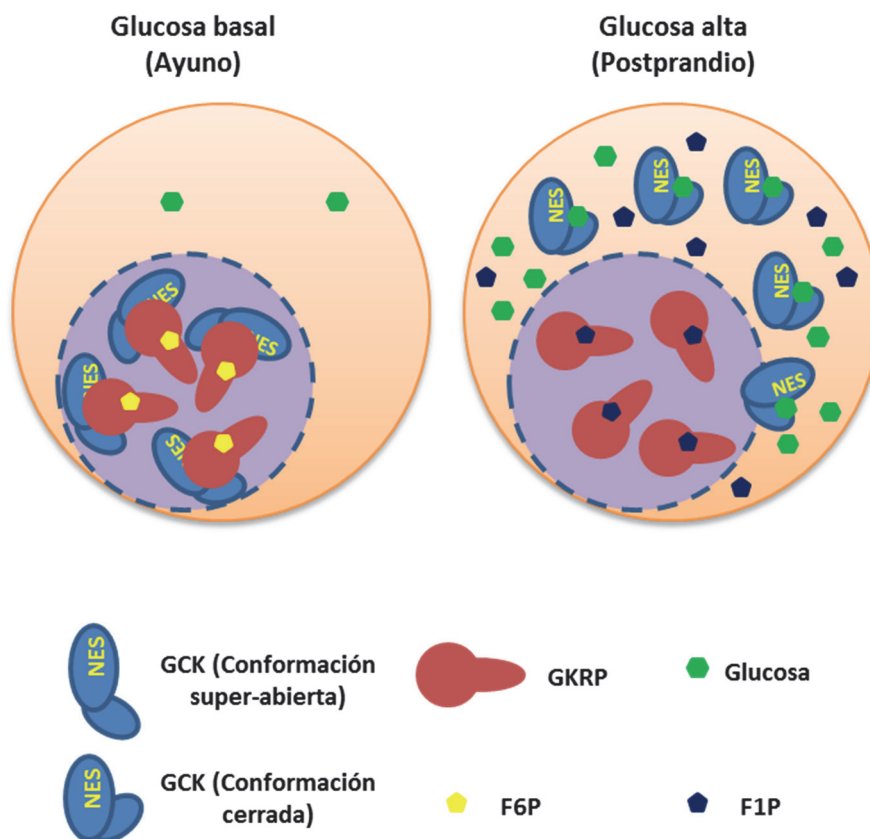


Figura 8. Regulación de la localización núcleo-citoplásmica de la glucokinasa por GKRPs.

Se muestra de forma esquemática un hepatocito en situaciones de glucosa basal y a altas concentraciones de glucosa. El compartimento nuclear (círculo morado) se comunica con el citoplasma a través del NPC. En condiciones de ayuno la glucokinasa se encuentra en su conformación super-abierta inactiva y acomplejada a la GKRPs en el núcleo celular. Debido al aumento de la concentración de glucosa y F1P que se da tras la ingesta, el complejo GKRPs-GCK se disocia, permitiendo que la glucokinasa sea exportada al citoplasma en su conformación cerrada activa. Imagen adaptada de (23).

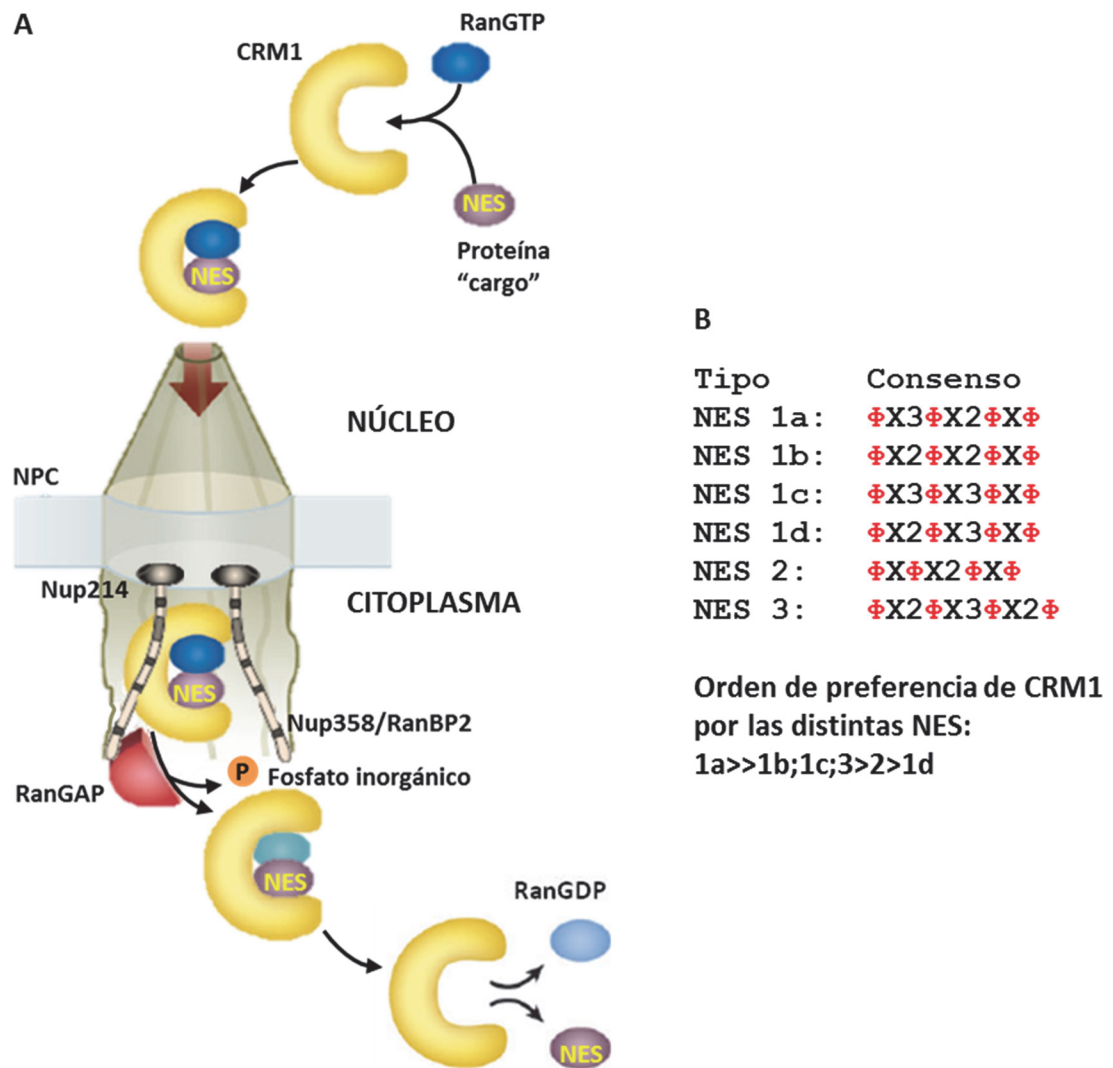


Figura 9. Exportación nuclear mediada por exportina 1/CRM1. La exportación nuclear de proteínas a través del NPC mediada por CRM1 requiere el reconocimiento de secuencias de exportación nuclear por parte de las exportinas. A) Esquema del mecanismo de transporte a través del NPC mediado por CRM1. Se muestra la formación del complejo heterotrimérico de CRM1, proteína cargo con NES y RanGTP en el núcleo. Este complejo atraviesa el complejo del poro gracias a su interacción con proteínas como Nup214 y Nup358, entre otras. En la región citoplásmica se estimula la actividad GTPasa de Ran. La hidrólisis de GTP provoca que RanGDP se libere promoviendo que CRM1 se disocie de la proteína exportada. Imagen adaptada de (163). B) Se muestran los consensos de los distintos tipos de NES reconocidos por CRM1 y el orden de preferencia de esta exportina por cada una de ellas según (167). Φ. Residuo hidrofóbico. X. Cualquier residuo de aminoácido.

3. Activadores de la glucokinasa (GKAs) como potenciales agentes terapéuticos para tratar la diabetes.

En la diabetes tipo I, donde un proceso autoinmune resulta en la carencia de células β pancreáticas y por lo tanto en la necesidad de insulina exógena como tratamiento, la activación adicional de la glucokinasa en el hígado y en otros tipos celulares podría ayudar a mejorar el control de la glucemia (12). En la diabetes tipo 2, se da un mal funcionamiento de las células β pancreáticas y una reducción de la masa celular de las mismas, ambos hechos se asocian a la resistencia a insulina del hígado, músculo y tejido adiposo. Aunque estados prediabéticos de intolerancia a la glucosa o formas poco severas de T2DM están asociados a un aumento moderado de la glucokinasa hepática, tanto en modelos animales como en pacientes obesos y con diabetes tipo 2, su actividad está disminuida (121, 169). También hay evidencias de que algo similar ocurre con la glucokinasa de células β pancreáticas (12). El papel de la glucokinasa en procesos fundamentales para el control de la homeostasis de glucosa, los cuales están alterados en la diabetes, ha hecho de esta enzima una potencial diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad. Las primeras investigaciones en este sentido se iniciaron hace casi dos décadas y resultaron en la identificación de la primera molécula activadora de la glucokinasa en 2003 (102). Desde entonces se han desarrollado más de 150 patentes con moléculas activadoras de la glucokinasa clasificadas en distintos tipos de acuerdo a su estructura química (170). Los GKAs se unen al sitio alostérico de la glucokinasa y ejercen su acción principalmente aumentando su afinidad por glucosa (disminuyen la $S_{0.5}$ por debajo de 2 mM). Algunos además incrementan la V_{max} hasta dos veces y eliminan la cooperatividad por glucosa,

confiriendo a la glucokinasa características más propias de las hexokinasa. Por otra parte, la unión de los GKAs estabiliza la conformación cerrada de la enzima dificultando su unión a GKRP y estimulando la translocación de la enzima desde el núcleo al citoplasma de los hepatocitos (76, 102, 140, 159, 171, 172). Por último, también se ha demostrado que los GKAs estimulan la proliferación de las células β pancreáticas y tienen un efecto protector frente a la apoptosis (173).

Experimentos realizados con modelos animales de diabetes tipo 2 y obesidad han mostrado que los GKAs estimulan la secreción de insulina, aumentan la captación hepática de glucosa a la par que disminuyen su producción y son altamente eficaces disminuyendo la hiperglucemia (102, 140, 173-178). Ensayos clínicos en humanos, realizados con tres moléculas diferentes, piragliatina, MK-0941 y AZD1656, han mostrado que inicialmente los GKAs reducen los niveles de glucosa plasmática e incrementan la secreción de insulina. Sin embargo, los tratamientos durante 3 a 6 meses producían efectos no deseados que causaron la finalización de los ensayos clínicos en todos los casos (179-182). Estos efectos fueron principalmente pérdida de efectividad en el tiempo, aumento de la incidencia de hipoglucemias y, en algunos casos, hipertrigliceridemia (179-182). Para minimizar el riesgo de hipoglucemia, actualmente la investigación en GKAs se está dirigiendo hacia el desarrollo de moléculas que activen parcialmente a la glucokinasa, es decir, que incrementen la actividad enzimática pero manteniendo la cooperatividad por glucosa, para evitar la activación de la enzima a bajas concentraciones de glucosa (170, 183, 184), o bien que activen específicamente la isoforma hepática de la glucokinasa (185). Algunos GKAs han sido modificados mediante la adición de cadenas laterales cargadas, para que únicamente sean reconocidos por transportadores específicos de hepatocitos (ej. familia OATP; *Organic Anion Transporting*

Polypeptide) (186). Sin embargo, aunque en modelos animales se obtuvieron resultados prometedores con el activador hepatoselectivo PF-04991532, en ensayos clínicos se observó un aumento de triglicéridos por lo que el ensayo fue interrumpido (187-189). Una estrategia alternativa ha sido desarrollar compuestos disruptores de la interacción GCK-GKRP. En 2013 Lloyd y colaboradores identificaron los primeros compuestos capaces de unirse a un sitio específico de la GKRP, promoviendo la disociación del complejo formado con la glucokinasa (134). Estos compuestos revertían el efecto inhibitorio de la proteína reguladora sobre la enzima y promovían su translocación al citoplasma, tanto en hepatocitos aislados como en hígado de animales. Además, normalizaban la glucemia en varios modelos diabéticos de roedores sin afectar a los normoglucémicos (134). Posteriormente, se han identificado otros compuestos que actúan mediante este mismo mecanismo (190-192). Aunque los estudios preclínicos han puesto de manifiesto el gran potencial de este tipo de fármacos, aún no hay datos disponibles de estudios en humanos.

Pese al indiscutible papel de la glucokinasa en la regulación de la homeostasis de glucosa, aún quedan por descifrarse distintos aspectos moleculares y celulares de la regulación específica de tejido de esta enzima, que permitan mejorar la comprensión de su función. En este trabajo se ha pretendido profundizar en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la actividad glucokinasa, mediante el estudio funcional de mutaciones identificadas en pacientes con MODY2 o HH-GCK. Mediante este estudio, además de proporcionar un diagnóstico molecular a las familias afectadas por dichas mutaciones, hemos analizado ciertos aspectos de la regulación de la glucokinasa, prestando especial atención a los mecanismos moleculares que regulan la translocación núcleo-citoplásmica de la enzima.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis.

Debido al papel central de la glucokinasa en la regulación de la homeostasis de glucosa, esta enzima es una de las principales dianas en los estudios encaminados al desarrollo de nuevas estrategias de terapia antidiabética. Para este fin se requiere un profundo conocimiento de los mecanismos de regulación de esta enzima en los distintos tejidos en los que actúa. Habida cuenta de que más del 99% de la glucokinasa total del organismo se expresa en el hígado y que una de las principales formas de regulación de la enzima en este tejido es su compartimentación núcleo-citoplásmica, nos proponemos analizar los mecanismos moleculares de esta regulación a partir de la caracterización de mutaciones naturales identificadas en pacientes con alteraciones monogénicas de la homeostasis de glucosa. Concretamente nuestros objetivos han sido los que se detallan a continuación.

Objetivos.

1. Determinar el efecto bioquímico de nuevas mutaciones MODY2 o HH-GCK sobre los parámetros cinéticos y la estabilidad proteica de la glucokinasa.
2. Estudiar el efecto molecular de ciertas mutaciones MODY2 sobre la compartimentación núcleo-citoplásmica de la enzima, analizando:
 - a) El efecto producido por las mutaciones en la interacción con la proteína reguladora de la glucokinasa GKR.
 - b) El efecto producido sobre la señal de exportación nuclear (NES) de la glucokinasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1. Mutaciones analizadas y características clínicas generales de los sujetos portadores.

Las mutaciones analizadas en este trabajo habían sido previamente identificadas en pacientes de hipoglucemia por hiperinsulinismo o de hiperglucemia familiar MODY2. La descripción de estas mutaciones se muestra en la Tabla 2.

1.2. Plásmidos

- ***pGEX-5X-2-GCK***. Este plásmido contiene insertado en la diana de restricción EcoRI del vector de expresión pGEX-5X-2 (Amersham, General Electric HealthCare; Fairfield, Connecticut, EEUU), el gen de la glucokinasa (*GCK*) pancreática humana en fase con el de la Glutathion-S-transferasa (122).

Los derivados mutantes de este plásmido se construyeron mediante mutagénesis dirigida, según se indica más adelante, utilizando los oligonucleótidos especificados en la Tabla 3. Las mutaciones V302E, R303W, R308W y A456V habían sido generadas previamente en nuestro laboratorio (García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168), 193, 194). Las mutaciones T60I, A201S, A201P y L309H se obtuvieron mediante la inserción de los cDNA, tras haber sido extraídos de los correspondientes plásmidos pEGFPC3-GCK, en el sitio de restricción EcoRI.

- ***pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾***. Este plásmido contiene el fragmento del gen de la glucokinasa de rata que codifica los residuos 299 al 359 en fase con la proteína verde fluorescente (GFP), en el vector pEGFPN2 (Clontech, Takara Bio USA, Inc. Kusatsu,

Prefectura de Shiga, Japón) (137). Los plásmidos pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ y pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3 fueron amablemente cedidos por el *Dr. M. Magnuson (Department of Molecular Physiology and Biophysics, University School of Medicine, Nashville, Tennessee, EEUU)*. Las mutaciones E300K, E300Q, L304P, L306R, L309H y L309P se incluyeron por mutagénesis dirigida en el plásmido que contenía la secuencia silvestre, utilizando los oligonucleótidos especificados en la Tabla 4. La doble mutación E300K/L304P se obtuvo por mutagénesis dirigida sobre el plásmido pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(L304P) utilizando los oligonucleótidos especificados en la Tabla 5. Los plásmidos portadores de las mutaciones V302E, R303W, K308R y K308W, habían sido previamente contruidos en nuestro laboratorio (García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168)).

- **pEGFPC3-GCK.** Este plásmido contiene el cDNA de la glucokinasa pancreática humana en fase con la GFP, en el vector pEGFPC3 (Clontech). Los cDNAs se extrajeron de las construcciones pGEX-5X-2-GCK silvestre y mutantes con la enzima de restricción EcoRI (Roche Diagnostics; Risch-Rotkreuz, Suiza) y la posterior inserción del fragmento aislado en el mismo sitio del vector pEGFPC3. En el caso de las mutaciones T60I, A201S, A201P, E300K, E300Q, L309H y L309P se realizó mutagénesis dirigida utilizando oligonucleótidos específicos detallados en la Tabla 5.

- **pCMV-HA-CRM1.** Contiene el cDNA de la exportina 1/CRM1 humana fusionado al epítipo HA en el extremo N-terminal y clonado en el vector pCMV-HA (Clontech) (García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168)).

- **pFlagCTC-GKRP.** Contiene el cDNA de la GKRP humana en fase con el epítipo FLAG-M2 (195). Este plásmido fue amablemente cedido por la Dra. KJ Brocklehurst (*Cardiovascular and Gastrointestinal Department, AstraZeneca, UK*).

- **TOPO-mCherry.** Este plásmido contiene el cDNA de la proteína mCherry clonado en la diana NotI del vector TOPO® (Life technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU). Fue amablemente cedido por el Dr. O. Vincent (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC-UAM).
- **pmCherry.** Este plásmido se obtuvo eliminando la EGFP del vector pEGFPN1 (Clontech) con las endonucleasas BamHI y NotI y el producto de la digestión se trató con Klenow (Roche Diagnostics). Tras realizar una electroforesis en gel de agarosa, se extrajo el DNA correspondiente al vector y se religó utilizando T4 DNA Ligasa (Roche Diagnostics). El nuevo plásmido se amplificó en *E. coli* y se utilizó como vector para ligar el cDNA de mCherry, obtenido del plásmido TOPO-mCherry, en el sitio EcoRI. La integridad de la construcción fue comprobada mediante análisis de restricción y secuenciación.
- **pmCherry-GKRP.** Este plásmido expresa la proteína de fusión GKRP-mCherry. El cDNA de la GKRP se amplificó mediante PCR desde el plásmido pFlagCTC-GKRP, con oligonucleótidos específicos que generaron extremos 5'-EcoRI y 3'-NotI (hGKRP-EcoRIRed 5'-GGGAATTCTGATGCCAGGCACAAAACGG-3' y hGKRP-NotIRed 5'-GGCGGCCGCCCTTGTCGTCATCGTCCTT-3'). El fragmento amplificado se introdujo en el vector TOPO®. El plásmido TOPO-GKRP fue digerido con EcoRI y NotI y ligado al vector pEGFPN1 en los mismos sitios. El producto de esta ligación a su vez fue tratado con NotI y ligado al cDNA de la proteína mCherry, obtenido a partir de TOPO-mCherry por digestión con el mismo enzima de restricción. La integridad de la construcción fue comprobada mediante análisis de restricción y secuenciación.

- **pACT2-GCK.** Contiene el cDNA de la glucokinasa pancreática humana en fase con una secuencia que codifica para el dominio de activación transcripcional de *Gal4* de *S. cerevisiae* (194). Los plásmidos portadores de las mutaciones fueron construidos mediante la extracción de los correspondientes cDNAs mutados desde los plásmidos pGEX-5X-2-GCK mutantes e introducidos en el vector pACT2 (Clontech) en los sitios BamHI y XhoI.
- **pGKB7-hGKRP.** Este plásmido contiene el cDNA de la GKRP humana, fusionado a una secuencia que codifica para el dominio de unión a DNA de *Gal4* de *S. cerevisiae* (196).

1.3. Microorganismos.

1.3.1. *Escherichia coli* (*E. coli*).

Todas las cepas de *E. coli* fueron crecidas a 37°C en medio LB, en presencia o ausencia de antibiótico. En el caso de las transformaciones con los plásmidos pGEX-5X-2-GCK, pACT2-GCK, pFlagCTC-GKRP y pGKB7-GKRP se utilizó ampicilina (Sigma-Aldrich; San Luis, Misuri, Estados Unidos) a 20 µg/ml. Para las transformaciones con los plásmidos pEGFPC3-GCK, pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾, pCMV-HA-CRM1, TOPO-mCherry, TOPO-GKRP, pmCherry y pmCherry-GKRP se utilizó kanamicina (Sigma-Aldrich) a 30 µg/ml.

Mutación (Cambio de aminoácido)	Mutación (Cambio de nucleótido)	Identificación
V55A	c.164T>C	Hospital de Cruces
T60I	c.179C>T	(197)
W99C	c.297G>T	Hospital de Cruces
A176E	c.627C>A	Hospital de Cruces
L184I	c.650C>A	Hospital de Cruces
G193R	c.677G>A	Hospital de Cruces
L184I/G193R/A201P	c.650C>A c.677G>A c.701G>C	Hospital de Cruces
A201P	c.701G>C	Hospital de Cruces
A201T	c.701G>A	Hospital de Cruces
A201S	c.601G>T	(60)
G246R	c.736G>A	Hospital de Cruces
E300K	c.898G>A	(198)
E300Q	c.898G>C	(198)
V302E	c.905T>A	Hospital Clinic
R303W	c.907C>T	(199)
L304P	c.911T>C	(200)
L306R	c.917T>G	(60)
R308W	c.922A>T	(194)
L309H	c.926T>C	(198)
L309P	c.926T>A	(60)
G328V	c.1083G>T	Hospital de Cruces
S373K/V374M	c.1118G>A c.1119C>A c.1120G>A	Hospital de Cruces
D409N	c.1325G>A	Hospital de Cruces

Tabla 2. Descripción de las mutaciones de la glucokinasa. Todos los pacientes portadores de las mutaciones indicadas presentaban las características clínicas generales de MODY2, salvo el paciente portador de la mutación W99C, que presenta hipoglucemia por hiperinsulinismo, fue diagnosticado a la edad de 25 años, con una glucemia basal de 2,9 mM, su nacimiento fue a término con un peso de 2400 g y responde bien al tratamiento con diazóxido. Se muestran los cambios de aminoácido y nucleótido, así como la referencia del estudio de identificación o, en el caso de las mutaciones no publicadas, el hospital donde se llevó a cabo la identificación. La numeración de los nucleótidos es relativa al primer nucleótido (A) del primer codón ATG designado como +1 y basada en la secuencia NM_000162. Hospital de Cruces, Vizcaya hace referencia a Grupo de investigación de endocrinología y diabetes. Comunicado por L. Castaño. Hospital Clinic, Barcelona, se refiere al Servicio de genética de dicho hospital. Comunicado por J. Oriola y R. Casamitjana.

Mutación		Oligonucleótido	Diana de restricción
V55A	GKV55Af	5'-GAGGCCAGTGCGAAGATGCTGCCACGTACGTGCGCTC-3'	BsiWI
	GKV55Ar	5'-GAGCGCACGTACGTGGGCAGCATCTTCGCACTGGCCTC-3'	
W99C	GKW99Cf	5'-GTGAGGAGGGGCAGGTAGCGTGAAGACCAAAC-3'	
	GKW99Cr	5'-GTTTGGTCTTCACGCTACACTGCCCCCTCTCAC-3'	
A176E	GKA176Ef	5'-GGGCTTCAAGGCATCAGGAGAGAAGGGAACAATG-3	Pierde Stul
	GKA176Er	5'-CATTGTTCCCTTCTCTCTGATGCCTGAAGCCC-3'	
L184I	GKL184If	5'-GAACAATGTCGTGGGGATCTCGGAGACGCTATC-3'	BamHI
	GKL184Ir	5'-GATAGCGTCTCGCAGGATCCCCACGACATTGTTTC-3'	
G193R	GKG193Rf	5'-GACGCTATCAAACGGAGAAGGGACTT-3'	
	GKG193Rr	5'-AAGTCCCTTCTCCGTTTGATAGCGTC-3'	
L184I/G193R/A201P	GKG193R/A201Pf	5'-CAAACGGAGAAGGGACTTTGAAATGGATGTGGTGCCATGGTGAATG-3	NcoI
	GKG193R/A201Pr	5'-CATTACCATGGGCACCATCCATTTCAAAGTCCCTTCTCCGTTTG-3'	
A201T	GKA201Tf	5'-GAAATGGATGTGGTGACCATGGTGAATGACACGGTG-3'	NcoI
	GKA201Tr	5'-CACCGTGTCATTACCATGGTCACCATCCATTTC-3'	
G246R	GKG246Rf	5'-GAATGTGGAGCTCGTGAGAGGGACGAGGGCCGCATG-3'	SacI
	GKG246Rr	5'-CATGCGGCCCTCGTCCCTCTCCACGAGCTCCACATTC-3'	
L304P	GKL304Pf	5'-CATGGGCGAGCTGGTGCGGCCTGTGCTGCTCAGGCTC-3'	XmaIII
	GKL304Pr	5'-GAGCCTGAGCAGCACCGGCCGACACAGCTCGCCCATG-3'	
L306R	GKL306Rf	5'-CTGGTGCGGCTTGTGCGGCTCAGGCTCGTGGAC-3'	
	GKL306Rr	5'-GTCCACGAGCCTGAGCCGCACAAGCCGCACACAG-3'	
G328V	GKG328Vf	5'-CAGCTGCGCACACGCGTAGCCTTCGAGACGCGCGCTTC-3'	MluI
	GKG328Vr	5'-GAAGCGCGCTCTCGAAGGCTACGCGTGTGCGCAGCTG-3'	
S373K/V374M	GKS373K/V374Mf	5'-GTGCGCCGCGCATGCGAGAAATGTCTACGCGCGCTG-3'	SphI
	GKS373K/V374Mr	5'-CAGCGCGCGTAGACATTTCTCGCATGCGCGGCGCAC-3'	
D409N	GKD409Nf	5'-CATCACTGTGGGCGTGAATGGATCCGTGTACAAGCTG-3'	BamHI
	GKD409Nr	5'-CAGCTGTACACGGATCCATTACGCCCCACAGTGATG-3'	

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las mutagénesis de pGEX-5X-2-GCK. En rojo se representan las bases alteradas para dar lugar a la sustitución de aminoácido y para introducir dianas de restricción sin afectar a la lectura proteica. El conjunto de bases subrayadas muestran el sitio de corte específico para cada caso. En ninguno de los casos la mutagénesis afecta a la fase de lectura.

Mutación		Oligonucleótido	Diana de restricción
E300K	ratgckE300Kf	5'-CACCATGGAATTCGGC <u>AGCT</u> GTACGACTTGTGCTG-3'	HindIII
	ratgckE300Kr	5'-CAGCACAAGTCGTAC <u>AGCT</u> GCCGAATTCCATGGTG-3'	
E300Q	ratgckE300Qf	5'-CACCATGGAATTCGGC <u>CAGCT</u> GTACGACTTGTGCTG-3'	PvuII
	ratgckE300Qr	5'-CAGCACAAGTCGTAC <u>CAGCT</u> GCCGAATTCCATGGTG-3'	
L304P	ratgckL304Pf	5'-GGC <u>GAGCT</u> GTACGACCTGTGTGCTGCTTAAGCTG-3'	SacI
	ratgckL304Pr	5'-CAGCTTAAGCAGCACACA <u>GGTCGTACGAGCT</u> CGCC-3'	
L306R	ratgckL306Rf	5'-GGTACGACTTGTGTGCGGCTTAAGCTGTGGACGAGAACC-3'	HindIII
	ratgckL306Rr	5'-GGTTCTCGTCCAC <u>AGCT</u> TAAGCGCACACAAGTCGTACC-3'	
L309H	ratgckL309Hf	5'-CTTGTGCTGCTCAGGC <u>ACGT</u> GACGAAAACCTGCTC-3'	PmlI
	ratgckL309Hr	5'-GAGCAGGTTTTCTGTC <u>CACGT</u> GCCTGAGCAGCACAAAG-3'	
L309P	ratgckL309Pf	5'-CTTGTGCTGCTCAGGCCTGTGGACGAAAACCTGCTC-3'	StuI
	ratgckL309Pr	5'-GAGCAGGTTTTCTGTCAC <u>AGGCCT</u> GAGCAGCACAAAG-3'	
E300K/L304P	ratgckE300K/L304Pf	5'-CCACCATGGAATTCGGC <u>AGCT</u> GTACGACCTGTGCTGC-3'	HindIII
	ratgckE300K/L304Pr	5'-GCAGCACAGGTCGTAC <u>AGCT</u> GCCGAATTCCATGGTG-3'	

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las mutagénesis de pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾. En rojo se representan las bases alteradas para dar lugar a la sustitución de aminoácido y para introducir dianas de restricción sin afectar a la lectura proteica. El conjunto de bases subrayadas muestran el sitio de restricción específico para cada caso. En ninguno de los casos la mutagénesis afecta a la fase de lectura.

Mutación		Oligonucleótido	Diana de restricción
T60I	GKT60If	5'-GTGTGAAGATGCTGCCCATCTACGTACGCTCCACCCAG-3'	SnaBI
	GKT60Ir	5'-CTGGGGTGGAGCGTAGCTAGATGGGCAGCATCTTCACAC-3'	
A201S	GKA201Sf	5'-GAAATGGATGTGGGTTCATGGTGAATGACACGGTG-3'	NcoI
	GKA201Sr	5'-CACCGTGTCATTCA CC ATGGA A CACCACATCCATTTC-3'	
A201P	GKA201Pf	5'-GAAATGGATGTGGTACCAATGGTGAATGACACGGTG-3'	KpnI
	GKA201Pr	5'-CACCGTGTCATTCA CC ATTG GT ACCACATCCATTTC-3'	
E300K	GKE300Kf	5'-GTGGCAAGTACATGGGCAGCTGTGCGGCTTGCTG-3'	HindIII
	GKE300Kr	5'-CAGCACAAGCCGCACAGCTG CC CATGTACTTGCCAC-3'	
E300Q	GKE300Qf	5'-GTGGCAAGTACATGGGCAGCTGTGCGGCTTGCTG-3'	PvuII
	GKE300Qr	5'-CACAAGCCGCAC CC AGCTGGCCCATGTACTTGCCAC-3'	
L309H	GKL309Hf	5'-CTTGTGCTGCTCAGGCACGTGGACGAAAACCTGCTC-3'	PmlI
	GKL309Hr	5'-GAGCAGGTTTTCTGCCAGTGCCTGAGCAGCACAAG-3'	
L309P	GKL309Pf	5'-CTTGTGCTGCTCAGGCCTGTGGACGAAAACCTGCTC-3'	StuI
	GKL309Pr	5'-GAGCAGGTTTTCTGCCACA GG CCCTGAGCAGCACAAG-3'	

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las mutagénesis de pEGFPC3-GCK. En rojo se representan las bases alteradas para dar lugar a la sustitución de aminoácido y para introducir dianas de restricción sin afectar a la lectura proteica. El conjunto de bases subrayadas muestran el sitio de restricción específico para cada caso. En ninguno de los casos la mutagénesis afecta a la fase de lectura.

1.3.1.1. DH5α. La cepa DH5α [*F*– Φ 80*lacZ*Δ*M15* Δ(*lacZYA-argF*) *U169 recA1 endA1 hsdR17* (*rK*[–], *mK*⁺) *phoA**supE44* λ– *thi-1 gyrA96 relA1*] de *E. coli*, se utilizó para distintos clonajes y subclonajes de forma rutinaria. La preparación de células competentes se realizó en presencia de RbCl, según el protocolo descrito en (201). La transformación se realizó mediante choque térmico como se describe en (202).

1.3.1.2. BL21. La cepa BL21 de *E. coli* [*F*– *ompThsdSB*(*rB*–, *mB*–) *gal dcm araB:T7RNAP-tetA*], se utilizó para la expresión y purificación de proteínas de fusión. La adquisición de competencia y transformación se realizó al igual que con la cepa DH5α (201, 202).

1.3.1.3. JM109. La cepa de *E. coli* JM109 [*endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17* (*rK*[–], *mK*⁺), *relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F'**traD36, proAB, lacI*^q*ΔM15]*, fueron adquiridas comercialmente a Promega Biotech Iberica S.L. (Madison, Wisconsin, EEUU) y transformadas según las instrucciones del fabricante. Estas bacterias fueron utilizadas en los clonajes que requerían alta eficiencia de transformación.

1.3.1.4. NovaBlue GigaSinglets™ Competent Cells. Esta cepa de *E. coli* [*endA1 hsdR17*(*rK12*[–] *mK12*⁺) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'*[*proA*⁺ *B*⁺*lacI*^q *ΔM15::Tn10 (Tc^R)*]] fue adquirida comercialmente a Merk-Millipore (Billerica, Massachusetts, EEUU) y transformadas siguiendo las instrucciones del proveedor. Estas bacterias fueron utilizadas en los clonajes que requerían muy alta eficiencia de transformación.

1.3.1.5. XL-10 Gold. La cepa XL10-Gold de *E. coli* [*Tet*^r*D(mcrA)*183 *D(mcrCB-hsdSMR-mrr)*173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacHte [F' proAB lacI*^q*ΔM15 Tn10 (Tet*^r*) Amy Cam*^r*]*], formaban parte del *kit* de mutagénesis *Quick Change Lightning* (Stratagene, Agilent Technologies; Santa Clara, California, Estados Unidos). Fueron

transformadas acorde a las instrucciones del fabricante, en transformaciones de plásmidos durante los procesos de mutagénesis dirigida.

1.3.2. Levaduras.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Y187 [MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *gal4 Δ* , *met-*, *gal80 Δ* , *URA3: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-LacZ*] (Clontech), fue utilizada para ensayos de doble híbrido. Para su cultivo se utilizó medio mínimo sintético dextrosa en ausencia de los suplementos apropiados para mantener la selección de los plásmidos.

1.3.3. Líneas celulares.

Las líneas celulares utilizadas fueron incubadas en condiciones constantes de humedad a 37°C y 5% de CO₂.

1.3.3.1. HepG2 (ATCC CRL-8065).

Línea celular derivada de carcinoma hepático humano. Se cultivó en medio MEM (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de FBS (Gibco®, Life Technologies), 2 mM de glutamina (Lonza; Basilea, Suiza), 10 mM de piruvato sódico (Sigma-Aldrich) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Lonza).

1.3.3.2. HEK293T (ATCC CRL-11268).

Línea celular derivada de riñón embrionario humano. Fue cultivada en medio DMEM (Gibco®) suplementado con 10% de FBS (Gibco®), 2 mM de glutamina (Lonza) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Lonza).

2. TÉCNICAS.

2.1. Técnicas básicas de biología molecular.

Las preparaciones de DNA plasmídico, los análisis de restricción, las amplificaciones de DNA por PCR, la clonación y la subclonación de cDNA se realizaron siguiendo los protocolos descritos en (202).

Las preparaciones de DNA plasmídico que requerían un producto final de gran pureza se realizaron a pequeña escala con los *kits NucleoSpin® plasmid* (Macherey-Nagel; Düren, Alemania) o *GeneJet plasmid* (Thermo Fisher Scientific), y a escala media con el *kit NucleoBond® XtraMidi* (Macherey-Nagel). La extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa se llevó a cabo con el *kit JETquick Gel extraction spin kit* (Genomed; Löhne, Alemania). La concentración de DNA se midió en un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific).

2.2. Mutagénesis dirigida.

Se realizó mutagénesis dirigida mediante el *kit Quick Change lighting* (Stratagene). Se utilizaron como DNA molde los plásmidos anteriormente mencionados, con los oligonucleótidos especificados en las Tablas 3, 4 y 5. Los productos de la mutagénesis, se sometieron a análisis de restricción cuando fue posible y se validaron por secuenciación

2.3. Transformación de levaduras y ensayos de doble híbrido.

El protocolo de transformación de levadura utilizado fue el descrito en (203). Se valoró la actividad β galactosidasa en ensayos en filtro tal y como se describe en (203).

Todos los ensayos realizados con levadura se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. O. Vincent.

2.4. Expresión y purificación de proteínas de fusión.

2.4.1. Expresión de las proteínas de GST-GCK silvestre y mutantes.

La cepa BL21 de *E. coli* fue transformada con los plásmidos pGEX-5X-2-GCK, silvestre o mutantes. Colonias individualizadas sirvieron para generar un preinóculo que fue cultivado en LB con ampicilina durante 8 horas a 37°C en agitador orbital. Se utilizaron 4/5 del volumen de los preinóculos generados para inocular un volumen final del mismo medio 50 veces superior al volumen del preinóculo utilizado. Tras una incubación de aproximadamente 90 minutos en agitador orbital a 37°C (hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0,5) se añadió IPTG (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,2 mM para inducir el promotor lactosa. La incubación se mantuvo en agitación durante 16 horas a 22 °C.

2.4.2. Purificación de las proteínas de GST-GCK silvestre y mutantes.

Las proteínas GST-GCK fueron purificadas por afinidad utilizando resina de glutatión-agarosa (Sigma-Aldrich) (204). Tras la inducción de la expresión de las proteínas de fusión, las bacterias transformadas fueron sedimentadas por centrifugación durante 10 minutos a 4°C y 5000 rpm. El sedimento de bacterias se resuspendió en 1/10 del volumen original utilizando tampón de resuspensión y lavado, el cual contenía PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4), DTT 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 5 mM y cóctel de inhibidores de proteasas (complete 1x, Roche Diagnostics). A continuación se añadió tritón X-100 (Bio-Rad; Hercules, California,

Estados Unidos) a una concentración final de 1% y se llevó a cabo la lisis bacteriana en una prensa *French® pressure Cell Press* (Thermo Fisher Scientific). Los lisados se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se incubó una hora a 4°C en agitación suave con resina de glutatión-agarosa, preparada previamente al 50% en PBS, con una relación de 30 µl de resina por mililitro de lisado. Posteriormente la resina fue lavada tres veces con el mismo tampón de resuspensión y lavado. Finalmente la elución se realizó en dos incubaciones sucesivas a temperatura ambiente y agitación con tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8, DTT 5 mM, KCl 200 mM y glutatión reducido 10 mM). Una parte del eluido se utilizó para determinar la concentración de proteína con el *kit Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad), así como para comprobar la integridad y pureza de la proteína mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles discontinuos de poliacrilamida (SDS-PAGE). El resto del eluido se conservó a -80°C en presencia de glicerol al 30% y glucosa 50 mM.

2.4.3. Expresión de GKRP-Flag.

La cepa BL21 de *E. coli* fue transformada con el plásmido pFlag-CTC-GKRP. Colonias individualizadas sirvieron para inocular 3 matraces con 15 ml de LB con ampicilina, que fueron incubados durante 8 horas a 37°C con agitación orbital. Se utilizaron 12 ml de los preinóculos para inocular 3 matraces de 2 l con 600 ml del mismo medio de cultivo. Tras 90 minutos de incubación a 37°C con agitación orbital (hasta alcanzar una $OD_{600nm} = 0,5$) se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM, manteniendo la incubación en agitación durante 64 horas a 16°C.

2.4.4. Purificación de GGRP-Flag.

La proteína GGRP-Flag fue purificada por afinidad utilizando *Anti FlagM2-affinity gel* (Sigma-Aldrich). Tras la inducción de la expresión de la proteína, las bacterias transformadas se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm y 4°C. El sedimento se resuspendió en un volumen final de 100 ml de tampón de resuspensión (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, DTT 1 mM y complete 1x). A continuación se añadió tritón X-100 a una concentración final de 1% y se llevó a cabo la lisis bacteriana en una prensa *French® pressure Cell Press*. Los lisados se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm y 4°C. Al sobrenadante se le añadió 4 ml de NaCl 5 M. A continuación el preparado se pasó por un filtro de 0,22 µm y se incubó en un matraz con 1 ml de *Anti FlagM2-affinity gel* durante 18h a 4°C con agitación suave. El *Anti FlagM2-affinity gel* se empaquetó en una columna de cromatografía, según indicación del fabricante, y se lavó con 30 ml de tampón de equilibrado (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, DTT 1 mM, NaCl 0,2 M y complete 1x). La elución se llevó a cabo haciendo pasar en 6 veces sucesivas, volúmenes de 0,5 ml del tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, DTT 1 mM, NaCl 0,2 M y péptido Flag 75 µg/ml (Sigma-Aldrich)). Se recolectaron aquellas fracciones en las que se detectó la proteína de interés, mediante el *kit Bio-Rad Protein Assay* y SDS-PAGE. Las fracciones seleccionadas se concentraron y dializaron 3 veces frente al tampón de almacenamiento (HEPES 25 mM pH 7,4, KCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM y DTT 1 mM), con los dispositivos de filtración por centrifugación Amicon® Ultra-4 30K (Merck-Millipore). La concentración de proteína se determinó mediante el *kit Bio-Rad Protein Assay* y la pureza e integridad de la proteína GGRP-Flag, se comprobó sometiendo la preparación a SDS-PAGE. Al preparado resultante se le añadió glicerol hasta una concentración final del 50% y se almacenaron fracciones de 20 µl a -80°C.

2.5. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó, previamente a la adición de glicerina, mediante el *kit Bio-Rad Protein Assay*, siguiendo instrucciones del fabricante y utilizando BSA (1 mg/ml) como estándar.

2.6. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La detección de las proteínas purificadas se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel discontinuo de poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel concentrador fue generado con una concentración de acrilamida: bisacrilamida (37,5:1) del 5% y Tris-HCl 0,12 M (pH 6,8), mientras que el gel separador se generó con una concentración de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) del 10% y Tris-HCl 0,4 M (pH 8,8). En ambos casos en presencia de APS 0,5% (Bio-Rad) y TEMED 0,05% (Bio-Rad). A las muestras se les añadió el volumen adecuado del tampón de carga 2x (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerina al 20%, SDS al 4%, azul de bromofenol al 0,05% y β -mercaptoetanol al 4%) y se hirvieron durante 2 minutos a 100°C. La electroforesis se desarrolló a 120 V en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,01%). La tinción de proteínas se realizó con azul de coomasie (Bio-rad) o con *BlueSafe* (NZYtech; Lisboa, Portugal) según indicaciones del fabricante.

2.7. Valoración de la actividad glucokinasa.

Los ensayos de actividad enzimática de la glucokinasa se realizaron acoplando la reacción de estudio a la de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y monitorizando la reducción de NADP a NADPH mediante la variación de la absorbancia a 340 nm (204, 205).

2.7.1. Caracterización cinética de la actividad enzimática de las proteínas de fusión GST-GK silvestre y mutantes.

Para determinar las constantes cinéticas respecto a la glucosa se utilizaron 14 concentraciones diferentes de este sustrato (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7,5; 10; 20; 30; 50; 75 y 100 mM) y una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), KCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, β-mercaptoetanol 1,4 mM, BSA al 0,1%, ATP-MgCl₂ 5 mM, NADP⁺ 1 mM, 1U de G6PDH (Roche Diagnostics) y GST-GCK. La reacción se inició con las distintas concentraciones de glucosa y se desarrolló a 30°C durante 5 minutos. Una unidad de enzima (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto en las condiciones descritas. Para determinar la velocidad máxima (V_{max}) de la reacción se utilizó la linearización de la ecuación de Michaelis-Menten descrita por Hanes-Wolf (a), mientras que para calcular la constante de afinidad de la enzima por glucosa (S_{0,5}) y la cooperatividad por este sustrato (h) se aplicó la ecuación de Hill (b).

$$(a) \frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{max}} \times [S] + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (b) \log \left[\frac{v}{V_{max} - v} \right] = h \times \log[S] - h \times \log[S_{0,5}]$$

Para valorar la actividad enzimática respecto al ATP, se utilizaron 9 concentraciones de sustrato (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1; 3 y 5 mM) y la misma mezcla de reacción anteriormente descrita, con la salvedad de que el ATP fue sustituido por glucosa a una concentración final igual a la S_{0,5} calculada para cada variante de glucocinasa. La K_m para el ATP fue determinada mediante la ecuación de Hanes-Wolf.

La constante catalítica (K_{cat}) se calculó como V_{máx}/mol de enzima, usando glucosa como sustrato y sus valores fueron normalizados a 37°C (206, 207).

El índice de actividad (*Ia*) fue determinado mediante la expresión matemática descrita en (208), a partir de las concentraciones intracelulares de glucosa (5mM) y ATP (2,5 mM) y los parámetros cinéticos: *Km*, *S*_{0,5}, *Kcat* y *h*, obtenidos experimentalmente.

$$Ia = \frac{Kcat}{S0.5^h} \times \frac{[ATP]}{[ATP] + Km} \times \frac{5^h \times 2}{5^h + S_{0.5}^h} \left(\frac{1}{s \times mmol^h} \right)$$

Además, para cada mutante se realizó el cálculo del índice de actividad relativo (*Iar*) dividiendo el índice de actividad por el de la proteína silvestre.

2.7.2. Ensayos de estabilidad de la glucokinasa en función de la temperatura.

Estos ensayos se realizaron a partir de diluciones de GST-GCK a 0,25 mg/ml en tampón de congelación (Tris-HCl 50 mM pH 8, DTT 5 mM, KCl 200 mM glicerol 30%, glucosa 50 mM y glutatión reducido 10 mM), como se había descrito en (196, 204). Las diluciones se incubaron a distintas temperaturas (30, 37, 42, 50, 52 y 55°C) durante 30 minutos y posteriormente se midió la actividad enzimática a concentración saturante de glucosa (100 mM). Se calculó el porcentaje de actividad relativo tomando como 100% la medida realizada tras la incubación a 30°C. Por otro lado se siguió la inactivación de GCK en el tiempo a la temperatura de 50 o 52 °C, según lo indicado en cada experimento. Para ello se incubaron las diluciones de proteína a la temperatura crítica durante 0, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos, previo a la valoración de actividad enzimática a 100 mM de glucosa. En este caso los porcentajes de actividad se refirieron a la actividad medida sin incubación previa (*t* = 0 min).

2.7.3. Ensayos de actividad glucokinasa en presencia de GKRP-Flag.

La actividad glucokinasa fue valorada en presencia de su inhibidor GKRP-Flag en un espectrofotómetro UVIKONxl (Secomam; Alès, Francia) a 30°C según se describe en (196, 209). La mezcla de reacción contenía Hepes 25 mM (pH 7,1), KCl 25 mM, ATP-MgCl₂ 1 mM, NADP 1 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 1U/ml de G6PDH y proteína GST-GCK silvestre o mutantes, a una concentración de 61 nM.

Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo en presencia de 10 μM de sorbitol 6-fosfato (S6P, Sigma-Aldrich) o 200 μM de fructosa 1-fosfato (F1P, Sigma-Aldrich) y distintas concentraciones de GKRP-Flag (0, 10, 50, 100 y 200 nM), en un volumen final de reacción de 50 μl. La reacción se inició con 5 mM de glucosa.

2.8. Transfecciones transitorias de líneas celulares en cultivo.

2.8.2. Transfección de HepG2.

Las células HepG2 fueron sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Menzel-Gläser; Braunschweig, Alemania) o placas de 60 mm de diámetro a una concentración de 50.000 células/ml. Se transfectaron 24 horas más tarde, cuando alcanzaron el 70% de confluencia, utilizando el reactivo de transfección *X-tremeGENE HP DNA* (Roche Diagnostics), según las instrucciones del fabricante.

2.8.3. Transfección de HEK293T.

Las células HEK293T, se sembraron sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro o placas de 60 mm de diámetro a una concentración de 40.000 células/ml y fueron transfectadas

16 horas más tarde, cuando se encontraban alrededor del 70% de confluencia, utilizando Lipofectamina® (Invitrogen, *Life Technologies*), según las instrucciones del fabricante.

2.9. Tratamiento con Leptomicina B de las células transfectadas.

En los casos indicados, las células transfectadas y cultivadas durante 42 horas, fueron tratadas con Leptomicina B (Sigma-Aldrich), diluida en el mismo medio de cultivo a una concentración de 40 nM, durante 6 horas.

2.10. Inmunodetección de proteínas mediante *western blot*.

Las células fueron cultivadas en placas de 60 mm de diámetro y transfectadas como se indica en apartados anteriores. 42 horas tras la transfección se lavaron con PBS y se recogieron en 100 µl de tampón que contenía Hepes pH 7,4 10 mM, KCl 142 mM, Triton x-100 0,2% y complete 1x. Las células se lisaron haciendo pasar las muestras 10 veces a través de una jeringa de 0,5 x 16 mm y manteniéndolas en hielo. Tras centrifugar los lisados a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, a los sobrenadantes se les añadió un volumen de tampón de carga 2x y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE como se describe en el apartado 2.6 y se transfirieron a membranas de PVDF mediante el sistema *Trans-BlotSemi-dry* (Bio-Rad), utilizando un tampón de transferencia que contenía Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, metanol al 20% y SDS al 0,01%. La transferencia se desarrolló durante 25 minutos a 15 voltios. Posteriormente las membranas de PVDF se bloquearon al menos durante 16 horas a 4°C en solución de bloqueo (TBS-T pH 7,6 [NaCl 140 mM, Tris 2 mM, Tween 20 al 0,1%] y leche desnatada al 5%). A continuación se llevó a cabo la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios durante una hora a

temperatura ambiente en solución de bloqueo y a las diluciones correspondientes (*rat anti HA* [Roche Diagnostics] 1:1000; *rabbit anti GFP-Nter* [Sigma-Aldrich] 1:4000; *Polyclonal anti DS-Red* [Clontech] 1:10000; *Monoclonal Mouse Anti-Actin* [MP biomedical; Santa Ana, California, Estados Unidos] 1:10000). El exceso de anticuerpo se eliminó con tres lavados en TBS-T de 10 minutos cada uno, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos secundarios, conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP) y diluidos en la misma solución de bloqueo (*Goat anti rat-HRP* [Cultek; Madrid, España] 1:4000; *Goat anti rabbit-HRP* [Upstate, Merck-Millipore] 1:10000; *ECL anti Mouse IgG, HRP-linked* [GE Healthcare] 1:10000). Las membranas se lavaron de nuevo con TBS-T. El revelado fue llevado a cabo mediante el reactivo ECL (GE Healthcare), y la quimioluminiscencia detectada mediante películas fotográficas *Kodak Biomax MR* (Sigma-Aldrich).

2.11. Fijación y montaje de las preparaciones de células transfectadas para su análisis mediante microscopía de fluorescencia.

Las células transfectadas se fijaron tratándolas con paraformaldehído (Merck-Millipore) al 4% durante 20 minutos. Las células fijadas se lavaron tres veces con 1 ml de PBS y para teñir los núcleos se trataron durante 5 minutos con DAPI (Life Technologies) a 0,1 µg/ml. Tras tres nuevos lavados con PBS los cubreobjetos se montaron y sellaron en portaobjetos con una gota de *Fluoromount G* (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, Inglaterra).

2.12. Inmunotinción de proteínas de fusión a HA.

En los casos requeridos, tras la fijación con paraformaldehído, se realizó la permeabilización de las células fijadas sobre cubreobjetos mediante tratamiento con Triton X-100 al 0,4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron tres veces con PBS, y se bloquearon mediante su incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con suero de cabra (NGS) al 10% y tritón x-100 al 0,1% en PBS. A continuación las preparaciones se incubaron con el anticuerpo *Monoclonal Rat anti-HA Tag antibody* (Roche Diagnostics) diluido 1:100 en el tampón de bloqueo. Tras eliminar el exceso de anticuerpo mediante tres lavados de diez minutos cada uno con PBS, se trataron las muestras con el anticuerpo secundario, *Goat AntiRat Ig (H&L): Texas Red* (AbD serotec, Bio-Rad) diluido 1:200 en el mismo tampón de bloqueo. Por último y tras eliminar el exceso de anticuerpo mediante tres nuevos lavados con PBS, las preparaciones se trataron con DAPI y se montaron como se describe en el apartado 2.11.

2.13. Análisis mediante microscopía de fluorescencia.

Una vez fijadas y montadas, las preparaciones celulares se analizaron mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio Leica DMRB (*Leica-Microsystems*, Wetzlar, Alemania). De cada preparación se analizaron, mediante visualización al microscopio, al menos cien células transfectadas para clasificarlas individualmente según la distribución de la fluorescencia, así se observara acumulación en el núcleo, en el citoplasma o de forma homogénea entre estos dos compartimentos.

La adquisición de imágenes, a la vez que la confirmación de la distribución de fluorescencia, se llevó a cabo con un microscopio Leica DMIRE2 con sistema confocal TCS SP2, utilizando un objetivo HCX PL APO 63x/1.4-0.6 Oil Lbd BL de inmersión en aceite, en el centro de Citometría y Microscopia de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid. El procesamiento de las imágenes adquiridas por microscopía confocal, así como el cálculo de las relaciones de intensidad de la fluorescencia núcleo-citoplasma, que se realizó obteniendo la intensidad media de áreas iguales de núcleo y citoplasma de las células, a partir de las imágenes adquiridas, se llevaron a cabo con el programa ImageJ (Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, USA).

2.14. Análisis bioinformáticos.

El análisis y la comparación de secuencias de DNA se llevaron a cabo con el programa *DNASTAR (Lasergene)* (196). El análisis de los modelos estructurales de la glucokinasa fue realizado mediante el *software Pymol Molecular Graphics System (Delano scientific)*. El análisis y la comparación de secuencias polipeptídicas fue llevado a cabo mediante el *software ClustalX2 (University College Dublin)*.

2.15. Análisis estadísticos.

El tratamiento estadístico se llevó a cabo como en (210). La distribución normal de los datos fue comprobada mediante el test *Shapiro-Wilk* (Statgraphics Centurion XVI; StatPoint technologies Inc). El método estadístico utilizado para las muestras con distribución normal fue el test *T de Student* de dos colas (Excel; Microsoft Office 2010). En los casos en los que la distribución no fue normal se utilizó el test *U de Mann-Whitney* (Statgraphics Centurion XVI). Se consideraron diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES IMPLICADAS EN HIPOGLUCEMIA POR HIPERINSULINISMO Y EN HIPERGLUCEMIA FAMILIAR MODY2.

Con el fin de identificar residuos potencialmente implicados en nuevos aspectos de la regulación *in vivo* de la glucokinasa, este trabajo se inició con la caracterización funcional de un grupo de mutaciones en el gen *GCK*, que implicaban cambios de aminoácido en la glucokinasa, y que habían sido previamente identificadas en pacientes de hipoglucemia por hiperinsulinismo o de MODY2. La descripción de estas mutaciones se muestra en la Tabla 2, del apartado 1.1 de Materiales y Métodos.

1.1. Localización de los residuos.

Como se muestra en las Figuras 10 y 11, los residuos de aminoácido afectados por las mutaciones se encuentran dispersos por toda la estructura tridimensional de la glucokinasa y están altamente conservados entre glucokinasas de distintas especies y en ciertos casos también entre las hexokinasas humanas.

Los residuos, Trp99, Ala176, Leu184, Gly193, Ala201, Gly246 y Asp409 están ubicados en el dominio menor de la glucokinasa (Figura 10). El residuo Asp409 está situado cerca del centro activo de la enzima. Los residuos Trp99 y Ala201 se encuentran en la región bisagra, cerca del sitio de unión de los activadores alostéricos de la glucokinasa y de la superficie de interacción con GKRP respectivamente. Por su parte, los residuos Val55, Gly328, Ser373 y Val374 forman parte del dominio mayor de la glucokinasa. El residuo Val55 está ubicado en el primer bucle conector de los dos dominios de la proteína, el cual participa en los cambios conformacionales de la enzima.

1.2. Producción y purificación de las proteínas de fusión GST-GCK silvestre y mutantes.

Los cambios de aminoácido correspondientes a las distintas mutaciones se generaron mediante mutagénesis dirigida del plásmido pGEX-5X-2-GCK silvestre que contiene el cDNA de la isoforma pancreática de la GCK humana fusionada a la GST, como se indica en el apartado 2.2 de la sección de Materiales y Métodos. Con los plásmidos silvestre y mutantes generados se transformó la cepa BL21 de *E. coli* para la expresión y purificación de las correspondientes proteínas de fusión GST-GCK, según se describe en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos. Se realizaron al menos tres purificaciones independientes de cada una de las proteínas de fusión. La concentración final de proteína purificada fue determinada y el rendimiento de las purificaciones se calculó como mg de proteína obtenida por litro de cultivo bacteriano de partida (Tabla 6).

Para la mayoría de las proteínas mutantes el rendimiento no difirió del obtenido para la proteína de referencia GST-GCK. Sin embargo, el rendimiento de los mutantes GST-GCK(V55A), GST-GCK(G193R) y GST-GCK(S373K/V374M), fue significativamente inferior. La proteína que portaba la doble mutación S373K/V374M quedaba retenida en la fracción insoluble desechada durante el proceso de purificación (resultados no mostrados), por lo que no pudo ser purificada a una concentración adecuada para llevar a cabo los posteriores análisis bioquímicos. La pureza e integridad de cada preparación se comprobó mediante SDS-PAGE y posterior tinción, observándose una única banda de aproximadamente 75 KDa correspondiente a las proteínas de fusión GST-GCK (Figura 12).

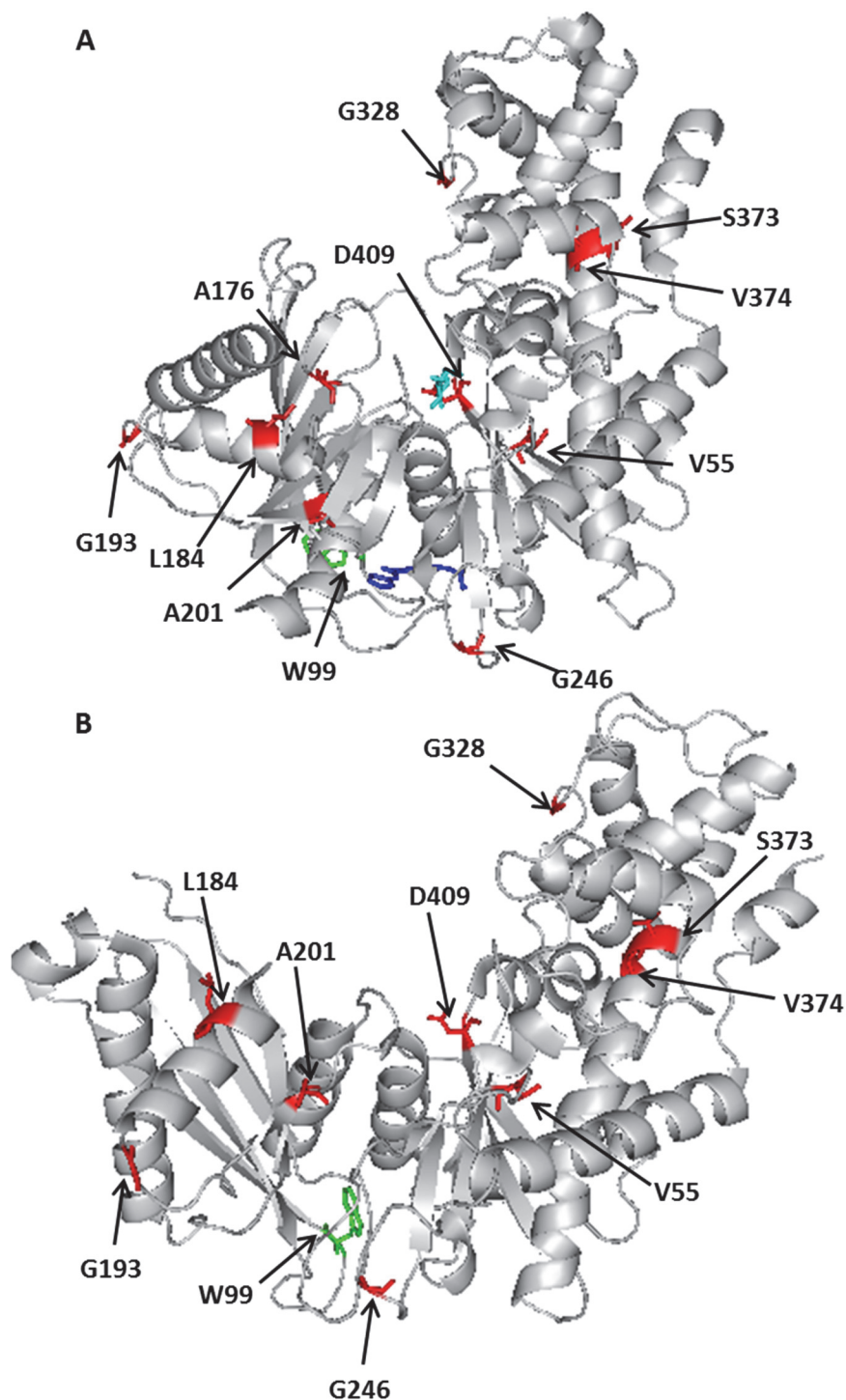


Figura 10. Localización de los residuos Val55, Trp99, Ala176, Leu184, Gly193, Ala201, Gly246, Gly328, Ser373, Val374 y Asp409 en el modelo estructural de la GSK. Las estructuras proteicas (PDB, códigos IV4S, conformación cerrada y IV4T, conformación super-abierta) se han representado utilizando el programa PyMOL. Los residuos cuyas mutaciones fueron identificadas como causa de hiperglucemia familiar MODY2 se muestran en rojo. El residuo Trp99, identificado como causa de hipoglucemia por hiperinsulinismo se muestra en verde. A) Conformación cerrada, en cian está representada la molécula de glucosa y en azul oscuro el GSK MRK (2-amino-4-fluoro5-[(1-metil-1H-imidazol-2-yl)sulfanil]-N-(1,3-tiazol-2-yl)benzamida). B) Conformación super-abierta.

Figura 11 (Página siguiente). Comparación de la secuencia polipeptídica de la GCK pancreática humana a otras glucocinasas y hexocinasas para analizar la conservación de los residuos afectados por las mutaciones. Los números indican las posiciones de los aminoácidos en las secuencias polipeptídicas. En rojo y mayor tamaño se muestran los residuos de interés. Se indica la estructura secundaria de la proteína en hélices α (sombreado azul) y láminas β (sombreado verde). El alineamiento de secuencias se ha realizado mediante el programa ClustalX2. Los residuos Leu184, Ala201, Gly246, Val374 y Asp409 están muy conservados entre glucocinasas de distintas especies y entre las hexocinasas humanas. Sin embargo, los residuos Val55, Trp99, Ala176, Gly193, Gly328 y Ser373 se encuentran conservados entre glucocinasas de distintas especies pero no entre las hexocinasas humanas.

HXK4_HUMAN -----MLDDRARMEAAKK 13
 HXK4_RAT -----MLDDRARMEATKK 13
 HXK4_MOUSE -----MLDDRARMEATKK 13
 HXK4_XENLA -----METFDQ 6
 HXK1_HUMAN ATLGAILNRLRDNKGTPLRRTTVGVDGSLYKTHPQYSRRFHTLRLVPDSDVRFLLSSESGSGKGAAMVTAVAYRLAEQH 467
 HXK2_HUMAN ATLA AVLQRIKENKGEERLRSTIGVDGSVYKKHPHFAKRLHKTVRRLVPGCDVRFRLRSEDGSGKGAAMVTAVAYRLADQH 467
 HXK3_HUMAN AALAAVLSCLQHSREQQTLQVAVATGGRVRCERHPRFCSVLQGTVMLLAPECDVSLIPSDVGGGRGVAMVTAVAARLAAHR 480

HXK4_HUMAN EKVEQILAEFQLQEEDLKKVMRRMQKEMDRGLRLETHEEASVKMLPTYVRSTPEGSEVGDFLSLDLGGTNFRVMLVKVGE 93
 HXK4_RAT EKVEQILAEFQLQEEDLKKVMSRMQKEMDRGLRLETHEEASVKMLPTYVRSTPEGSEVGDFLSLDLGGTNFRVMLVKVGE 93
 HXK4_MOUSE EKVEQILAEFQLQEEDLKKVMSRMQKEMDRGLRLETHEEASVKMLPTYVRSTPEGSEVGDFLSLDLGGTNFRVMLVKVGE 93
 HXK4_XENLA NEVDQILSEFHLQEEDLHVL MCRMQAEMERGLHLETNEEASVKMLPTYVRSTPDGSEVGDFLALDLGGTNFRVMLVKVGE 86
 HXK1_HUMAN RQIEETLAHFHLTKDMLLEVKKRMAEMELGLRKQTHNAVVKMLPSFVRRTPDGTENGDFLALDLGGTNFRVLLVKIRS 547
 HXK2_HUMAN RARQKTLEHLQLSHDQLLEVKKRMKVEMERGLSKETHASAPVKMLPTYVCATPDGTEKGDFLALDLGGTNFRVLLVVRN 547
 HXK3_HUMAN RLLEETLAPFRLNHDOLA AVQAOMRKAMAKGLR---GEASSLRMLPTFVRATPDGSERGDFLALDLGGTNFRVLLVVRVT 557

α-1 α-2 β-1 β-2 β-3

HXK4_HUMAN GEEGQSVKTKHQMYSIPEDAMTGTAEMLFDYISECISDFLDKHKMKHKKPLGFTSFPPVRHEDIDKGILLNWTGKFKA 173
 HXK4_RAT GEAGQSVKTKHQMYSIPEDAMTGTAEMLFDYISECISDFLDKHKMKHKKPLGFTSFPPVRHEDIDKGILLNWTGKFKA 173
 HXK4_MOUSE GEAGQSVKTKHQMYSIPEDAMTGTAEMLFDYISECISDFLDKHKMKHKKPLGFTSFPPVRHEDIDKGILLNWTGKFKA 173
 HXK4_XENLA DLEGGKVETKHKMYSIPVDAMTGTAEMLFDYIAECISDYLDQNMKHKHKKPLGFTSFPPVRHEDIDKGILLNWTGKFKA 166
 HXK1_HUMAN GK--KTVEMHNKIYAIPIEIMQGTGEELFDHIVSCISDFLDYMGIGKPRMPLGFTSFPPCQQTSLDAGILITWTGKFKA 625
 HXK2_HUMAN GK--WGVEMHNKIYAIPOEVMHGTGDELFDHIVQCIADFLEYMGKGVSLPLGFTSFPPCQQNSLDESILLKWTGKFKA 625
 HXK3_HUMAN G----VOITSEIYSIPETVAQSGGOOLFHDIVDCIVDFQKQGLSGQSLPLGFTSFPPCROGLDQKILLNWTGKFKA 631

β-4 α-3 β-5 β-6 β-7

HXK4_HUMAN SGAEGNNVVGLLRDAIKRRGDFEMDVVMVNDTVATMISCYEDHQCEVGMIVGTGCNACYMEEMQNVELVEGDEGRMCV 253
 HXK4_RAT SGAEGNNIVGLLRDAIKRRGDFEMDVVMVNDTVATMISCYEDRQCEVGMIVGTGCNACYMEEMQNVELVEGDEGRMCV 253
 HXK4_MOUSE SGAEGNNIVGLLRDAIKRRGDFEMDVVMVNDTVATMISCYEDRQCEVGMIVGTGCNACYMEEMQNVELVEGDEGRMCV 253
 HXK4_XENLA SGAEGNNVVGLLRDAIKRRGDFEMDVVMVNDTVATMISCYEDHHCCEVGLIVGTGCNACYMEEMSVELVEGEEGRMCV 246
 HXK1_HUMAN TDCVGHVVTLLRDAIKRRGEFDLDVVVNDTVGTMTCAYEEPTCEVGLIVGTGSNACYMEEMKNVEMVEGDQDQMC 705
 HXK2_HUMAN SGCEGEDVVTLLKEAIHRRGEFDLDVVVNDTVGTMTCGFEDPHCEVGLIVGTGSNACYMEEMRNVELVEGEEGRMCV 705
 HXK3_HUMAN SDCEGQDVVSLREAITRRQAVELNVVIVNDTVGTMSCGYEDPRCEIGLIVGTGSNACYMEELRNNAVGP GDSGRMCI 711

α-4 β-8 α-5 β-9 β-10 β-11

HXK4_HUMAN NTEWGAFDGSSELDEFLL EYDRLVDESSANPGQQLYEKLIIGGKYMGEVLRLVLLRLVDENLLFHGEASEQLRTRGAFETR 333
 HXK4_RAT NTEWGAFDGSSELDEFLL EYDRMVDESSANPGQQLYEKLIIGGKYMGEVLRLVLLKLVDENLLFHGEASEQLRTRGAFETR 333
 HXK4_MOUSE NTEWGAFDGSSELDEFLL EYDRMVDESSVNPQQLYEKLIIGGKYMGEVLRLVLLKLVEENLLFHGEASEQLRTRGAFETR 333
 HXK4_XENLA NTEWGAFDGTGELEDFRLEYDRVDEASLNPQQLYEKMIIGGKYMGEVLRLVLIKVNENLLFGGESEKLRTRGAFETQ 326
 HXK1_HUMAN NMEWGAFDNGCCLDDIRTHYDRLVDEYSLNAGKQRYEKMISGMYLGEIVRNILIDFTKKGFLFRGQISETLKRTRGIFETK 785
 HXK2_HUMAN NMEWGAFDNGCCLDDIRTEFDVADEL SLNPGKQRF EKMI SGMYLGEIVRNILIDFTKRGLLFRGRISERLKRTRGIFETK 785
 HXK3_HUMAN NMEWGAFDGDGSLAMLS TRFDASVDOASINPGKQRF EKMI SGMYLGEIVRHILLHLTSLGVLFGRGQIQRLQTRDIFKTK 791

α-6 α-7 α-8

HXK4_HUMAN FVSQVESD TGDRKQIYNILSTLGLRPSVTD CDIVRRACE SVSTRAAHMCSAGLAGVINRMRESRSEDV MRITVGVG GSVY 413
 HXK4_RAT FVSQVESD SGDRKQIHNILSTLGLRPSVTD CDIVRRACE SVSTRAAHMCSAGLAGVINRMRESRSEDV MRITVGVG GSVY 413
 HXK4_MOUSE FVSQVESD SGDRRQILNISTLGLRPSVAD CDIVRRACE SVSTRAAHMCSAGLAGVINRMRESRSEDV MRITVGVG GSVY 413
 HXK4_XENLA FVSQIEADTSDFKQTLNILRTLGLVQATIGDCHAVRLACE SVSTRAAIMCSAGLAGILNMRQSRREELRITVGVG GSVY 406
 HXK1_HUMAN FLSQIESDRLALLQVRAILQQLGLNSTCDDSIIVKTVCG VVSRRAAQLCGAGMAAVVDKIRENRGLDRLNVTVGVG GTLY 865
 HXK2_HUMAN FLSQIESDCLALLQVRAILQHLGLESTCDDSIIVKEVCT VVARAAQLCGAGMAAVVDRIENRGLDALKVTVGVG GTLY 865
 HXK3_HUMAN FLSEIESDSLALROVRAILEDLGLPLTSDDALMVLEVCO AVSORAAQLCGAGVAAVVEKIRENRGLEELAVSVGV GTLY 871

α-9 α-10 α-11 β-12

HXK4_HUMAN KLHPSFKERFHASVRRITPSCEITFIESEEGSGRGAALVS AVACKKACMLGQ 465
 HXK4_RAT KLHPSFKERFHASVRRITPNCEITFIESEEGSGRGAALVS AVACKKACMLAQ 465
 HXK4_MOUSE KLHPSFKERFHASVRRITPNCEITFIESEEGSGRGAALVS AVACKKACMLGQ 465
 HXK4_XENLA KLHPSFKDKFHATVLKLTSGCEITFIQSEEGSGRGAALISAVAYKMAVMIGH 458
 HXK1_HUMAN KLHPHF SRIMHQT VKELSPKCNVSFLL SEDGSGKGAALITAVGVRLRTEASS 917
 HXK2_HUMAN KLHPHF AKVMHETVKDLAPKCDVSFLQ SEDGSGKGAALITAVACRIREAGQR 917
 HXK3_HUMAN KLHPRFSSIVAATVRELA PRCVVTFLO SEDGSGKGAALVTAVACRLAQLTRV 923

α-12 β-13 α-13

Proteína	Rendimiento proteico (mg /L)
GST-GCK	4,6 ± 1,6
GST-GCK(V55A)	1,1 ± 0,1*
GST-GCK(W99C)	3,4 ± 2,0
GST-GCK(A176E)	3,8 ± 0,8
GST-GCK(L184I)	4,2 ± 0,2
GST-GCK(L184I/G193R/A201P)	4,1 ± 1,3
GST-GCK(G193R)	1,9 ± 0,8*
GST-GCK(A201P)	3,7 ± 1,3
GST-GCK(A201T)	4,1 ± 2,5
GST-GCK(G246R)	4,5 ± 1,3
GST-GCK(G328V)	3,4 ± 0,6
GST-GCK(S373K/V374M)	0,2 ± 0,1*
GST-GCK(D409N)	4,5 ± 1,6
GST-GCK(A456V)	4,6/3,7

Tabla 6. Rendimiento de purificación de las proteínas de fusión GST-GCK silvestre y mutantes. Los resultados se muestran como media ± SD de los valores obtenidos en al menos tres purificaciones independientes, excepto para la proteína GST-GCK(A456V), utilizada como control en ciertos ensayos bioquímicos a lo largo de este trabajo, para la que se llevaron a cabo solo 2 purificaciones. Los datos se expresan en miligramos de proteína obtenida por litro de cultivo de partida. La concentración de proteína se determinó mediante el *kit Bio-Rad Protein Assay*, siguiendo instrucciones del fabricante y utilizando BSA (1 mg/ml) como estándar. (*) Se consideraron diferencias significativas valores de $p < 0,05$ respecto a la proteína silvestre utilizando el método estadístico *T de Student*.

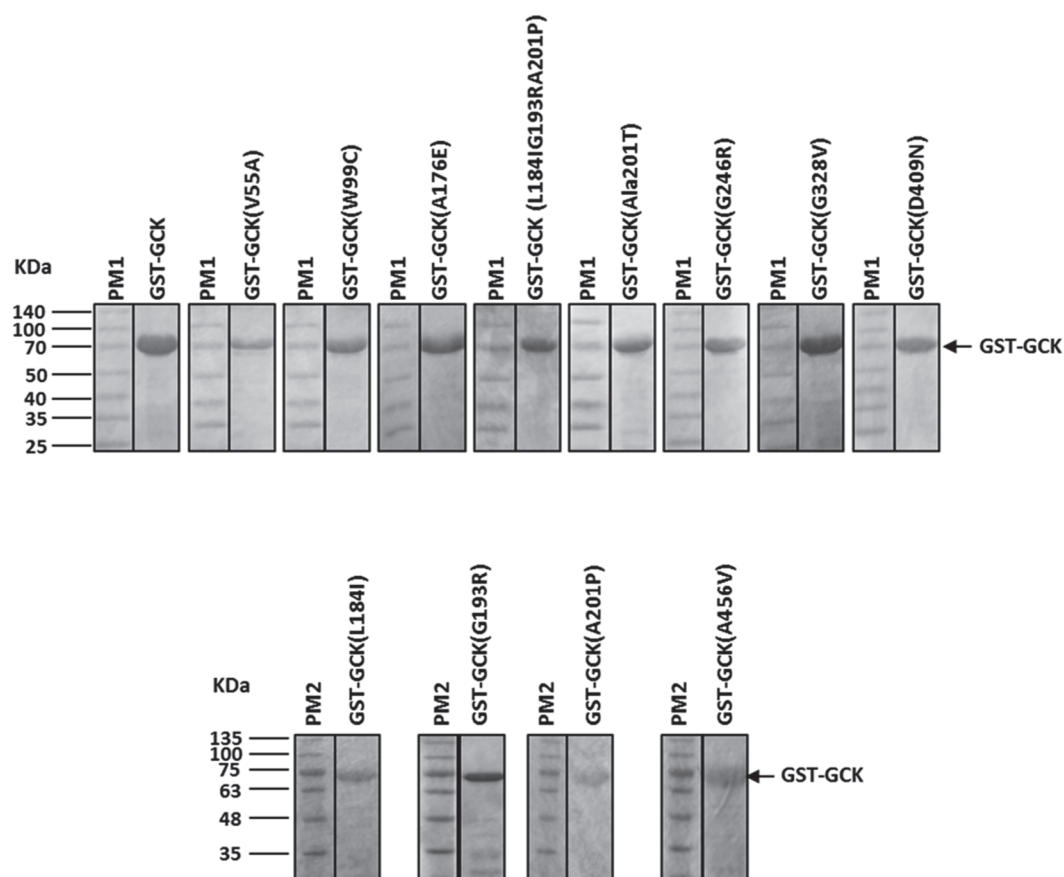


Figura 12. Proteínas de fusión GST-GCK purificadas. Se muestra una figura representativa de cada una de las proteínas purificadas tras ser sometidas a SDS-PAGE al 10% y tinción con coomasie, salvo en el caso de los mutantes GST-GCK(L184I) y GST-GCK(A201P) y GST-GCK(A456V) cuya tinción se realizó con *BlueSafe*, como se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. Se señala con una flecha la banda correspondiente a GST-GCK. PM1: marcador de peso molecular *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas; Thermo Fisher Scientific). PM2: *NZY Colour Protein Marker II* (NZYTech). A modo ilustrativo se señalan los pesos moleculares de ambos patrones en un caso para cada tipo.

1.3. Análisis cinético de las proteínas GST-GCK purificadas.

Para analizar la actividad enzimática dependiente de glucosa, se realizaron los ensayos en un rango de concentraciones de este sustrato entre 0,1 y 100 mM. De forma similar, la valoración de la actividad glucokinasa dependiente de ATP se realizó en un rango de concentraciones entre 0,02 y 5 mM. El índice de actividad relativo (Iar) se calculó englobando todos los parámetros cinéticos, como se indica en el apartado 2.7.1 de Materiales y Métodos, y se utilizó para analizar el efecto global de cada una de las mutaciones sobre la actividad de la enzima.

Los resultados presentados en la Tabla 7 muestran que las mutaciones MODY2 A176E y L184I/G193R/A201P son las que ejercen un efecto negativo mayor. Los correspondientes mutantes han perdido prácticamente en su totalidad la actividad catalítica, con un índice de actividad inferior al 0,01% del de la proteína de referencia GST-GCK. Aunque debido a la baja actividad de estos mutantes los valores obtenidos han de considerarse como meras aproximaciones, se observa una reducción de más del 97% en la Kcat, acompañada de una disminución de la afinidad por ambos sustratos, glucosa y ATP (aumento de los valores de $S_{0,5}$ y K_m), junto a la pérdida de cooperatividad por glucosa (disminución del valor de h). El análisis individual de las mutaciones portadas en el triple mutante muestra que las tres producen efectos inactivantes, siendo el más fuerte aquel ejercido por la mutación A201P, cuyo índice de actividad ya es inferior al 0,01% del valor de referencia. Es interesante destacar que, sin embargo, el mutante A201T, en el que la Ala201 es sustituida por treonina en vez de prolina, aún conserva el 25% de la actividad de referencia.

Las mutaciones MODY2 V55A, G246R, G328V y D409N también reducen significativamente el índice de actividad de la GCK. La mutación V55A disminuye la afinidad de la glucokinasa por ambos sustratos y la Kcat en más del 70%. Además este mutante ha perdido la cooperatividad por glucosa ($h = 1,03 \pm 0,03$), así el índice de actividad de este mutante es el 7% del valor de referencia. En el caso de las mutaciones G246R y G328V, los principales efectos fueron la reducción de la Kcat y el aumento de la $S_{0,5}$ para glucosa. La mutación D409N produce una reducción de la cooperatividad por glucosa ($h = 1,13 \pm 0,13$), una disminución del 93% del valor de la Kcat y un aumento de la K_m para el ATP. Sin embargo, estos defectos están parcialmente compensados por un pequeño, pero significativo, aumento de la afinidad por glucosa ($S_{0,5} = 5,1 \pm 0,3$ mM), de tal manera que este mutante muestra un índice de actividad de aproximadamente el 30% del de la proteína de referencia GST-GCK.

Por el contrario, la mutación HH-GCK W99C incrementa la actividad glucokinasa. La proteína GST-GCK(W99C) presenta mayor afinidad tanto por glucosa como por ATP ($S_{0,5} = 3,5 \pm 0,2$ y $K_m = 0,22 \pm 0,04$ mM, respectivamente). Además, provoca un aumento del 30% en la constante catalítica ($K_{cat} = 93,3 \pm 2,7$ s⁻¹), a la vez que produce un ligero descenso en el coeficiente de Hill, por lo que el índice de actividad de este mutante es más de 11 veces superior que el de referencia.

En resumen, de las mutaciones analizadas, aquellas identificadas en pacientes con hiperglucemia MODY2 tienen un efecto inactivante sobre la glucokinasa. La reducción en la actividad global, observada en todos los casos como una disminución en el IAR , es debida a una combinación de defectos que afectan, en mayor o menor grado, a todos los parámetros cinéticos. Sin embargo, la mutación W99C, identificada en un

paciente con HH, resulta ser activadora ya que incrementa el k_m al aumentar la constante catalítica y la afinidad por los sustratos.

1.4. Análisis de la estabilidad de las proteínas de fusión GST-GCK silvestre y mutantes en función de la temperatura.

Para analizar el posible efecto de las mutaciones sobre la estabilidad de la GCK se llevaron a cabo experimentos en los que se valoró la actividad enzimática, a una concentración saturante de glucosa (100 mM), tras incubar las proteínas purificadas durante 30 min en un rango de temperaturas entre 30 y 55°C.

Los resultados se muestran en la Figura 13. Los mutantes GST-GCK(V55A), GST-GCK(L184I), GST-GCK(G193R) y GST-GCK(A201P) perdían más del 70% de su actividad tras incubarse a 50°C. La más afectada era la proteína GST-GCK(V55A), cuya actividad se reducía al 50% tras la incubación a 37°C (Figura 13A). Sin embargo, la actividad de los demás mutantes ensayados, al igual que la proteína de referencia GST-GCK, permanecía prácticamente constante hasta una temperatura de 50°C y disminuía a temperaturas superiores (Figura 13B y 13C). Las mutaciones A201T, G246R y G328V se inactivaban cuando eran incubadas a temperaturas iguales o superiores a 52°C (Figura 13B), mientras que las mutaciones A176E y D409N lo hacían solo tras la incubación a 55°C (Figura 13C). La mutación activadora W99C no produjo efecto significativo sobre la estabilidad de la actividad glucokinasa a ninguna de las temperaturas ensayadas (Figura 13C).

Para analizar la cinética de inactivación a elevada temperatura, las proteínas GST-GCK(V55A), GST-GCK(L184I), GST-GCK(G193R) y GST-GCK(A201P) fueron incubadas a 50°C durante distintos periodos de tiempo, previo a la valoración de la actividad enzimática. Como se muestra en la Figura 14A, las proteínas GST-GCK(V55A) y GST-

GCK(A201P) sufrían una rápida inactivación, perdiendo más del 75% de actividad tras 5 minutos de incubación a 50°C. Sin embargo, las proteínas GST-GCK(G193R) y GST-GCK(L184I) sufrían una disminución paulatina de la actividad glucokinasa conforme aumentaban los tiempos de incubación.

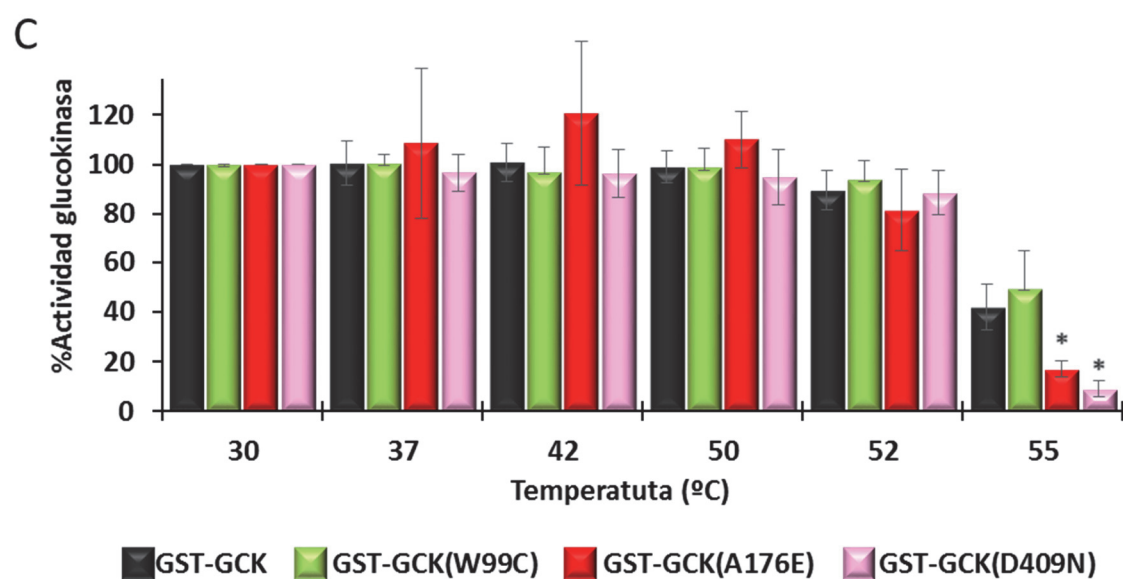
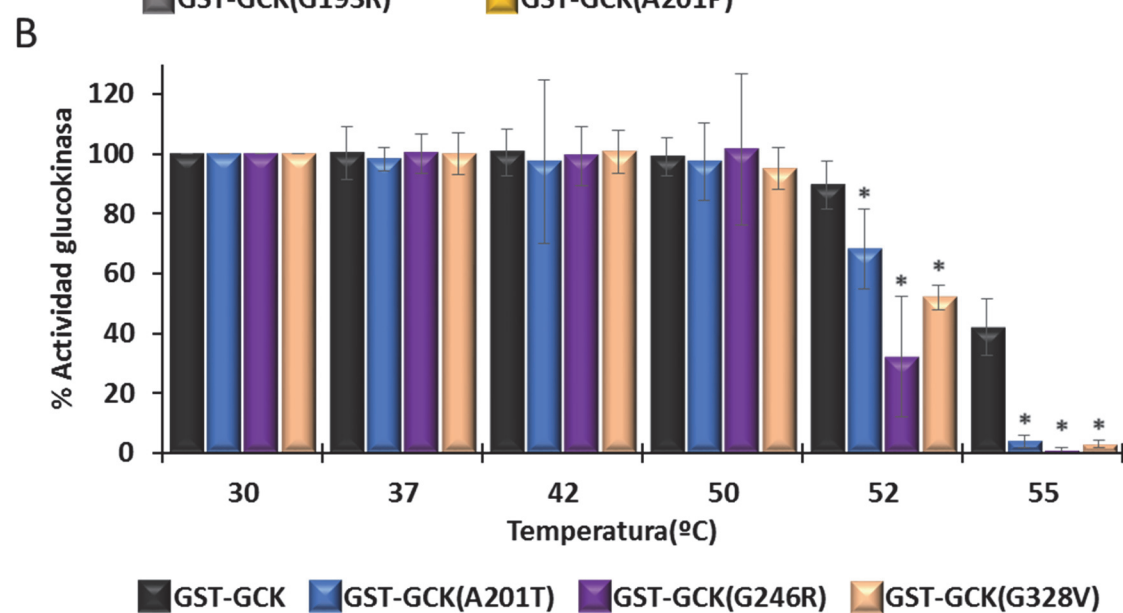
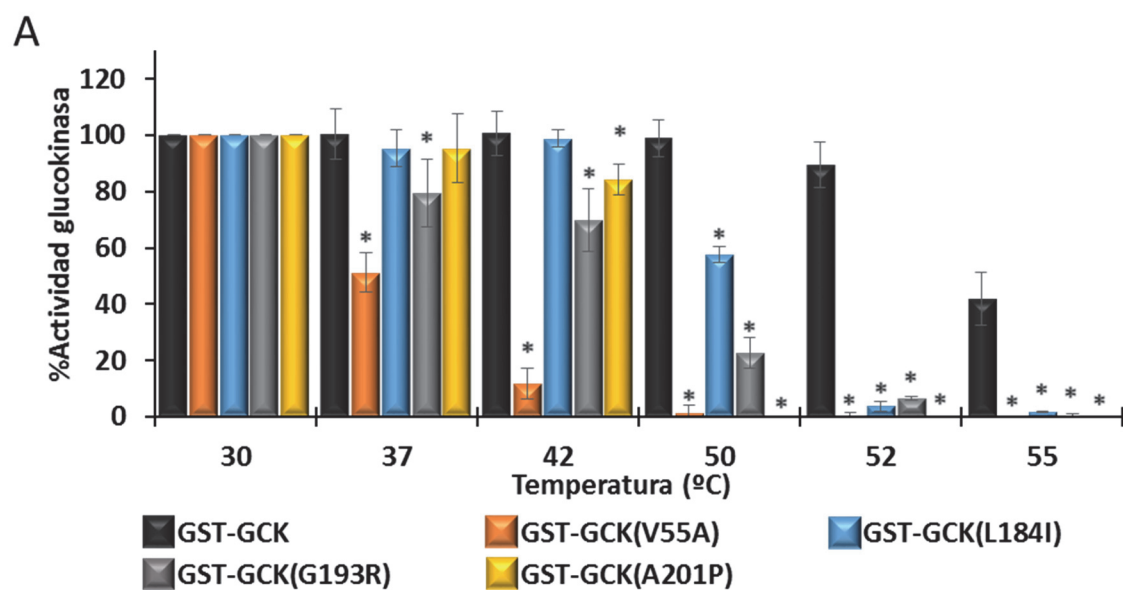
En la Figura 14B se muestran las cinéticas de inactivación de las proteínas GST-GCK portadoras de las mutaciones W99C, A201T, G246R, G328V, A176E y D409N a 52°C, comparadas a la referencia GST-GCK. En el caso de las mutaciones A176E, A201T, G246R y G328V, la actividad glucokinasa se redujo paulatinamente conforme aumentaba el tiempo de incubación, disminuyendo por debajo del 30% a los 60 min. Por el contrario, las proteínas GST-GCK(D409N) y GST-GCK(W99C) presentaron un comportamiento similar a la proteína de referencia GST-GCK.

En conjunto, estos resultados indican que las mutaciones V55A y A201P inducen una fuerte inestabilidad en la glucokinasa, L184I y G193R lo hacen de manera moderada, mientras que las mutaciones A201T, G246R, G328V y A176E tienen un carácter levemente desestabilizador. Por el contrario las mutaciones D409N y W99C no afectan a la estabilidad de la enzima.

Tabla 7 (Página siguiente). Parámetros cinéticos de las proteínas GST-GCK silvestre y mutantes. Los ensayos fueron llevados a cabo en un lector de microplacas *Varioskan Flash Multimode Reader* (Thermo Fisher Scientific) y los parámetros cinéticos calculados como se describe en el apartado 2.7.1 de Materiales y Métodos. El índice de actividad de cada mutante fue referido al de la proteína de referencia GST-GCK para obtener los valores de Índice de actividad relativo (Iar). Los datos se expresan como media \pm SD de 6 valoraciones de actividad de proteínas procedentes de al menos tres purificaciones independientes, salvo en el mutante L184I/G193R/A201P en el que se realizaron 4 valoraciones de proteínas procedentes de 2 purificaciones independientes, n es el número de valoraciones realizadas. El coeficiente de Hill (h) y el Iar carecen de unidades. Notese que los datos correspondientes a la proteína de referencia GST-GCK muestran las medias obtenidas en los experimentos llevados a cabo en este apartado y los mostrados en el apartado 1.6.1 (Tabla 9). (*) Se consideraron diferencias significativas valores de $p < 0,05$ al comparar los valores obtenidos con la proteína de referencia GST-GCK. Se utilizó el test *U* de Mann–Whitney en el caso de Iar y el *T* de Student para el resto de los parámetros.

Proteína	Kcat (s ⁻¹)	h	S _{0,5} para Glucosa (mM)	Km para ATP (mM)	lar
GST-GCK (n=23)	71,9 ± 7,3	1,62 ± 0,05	7,5 ± 0,4	0,47 ± 0,04	1 ± 0
GST-GCK(V55A) (n=6)	19,0 ± 1,3*	1,03 ± 0,03*	26,3 ± 3,3*	2,10 ± 0,30*	0,07 ± 0,01*
GST-GCK(W99C) (n=6)	93,3 ± 2,7*	1,36 ± 0,07*	3,5 ± 0,2*	0,22 ± 0,04*	11,92 ± 0,06*
GST-GCK(A176E) (n=6)	2,0 ± 0,3*	1,18 ± 0,05*	48,4 ± 5,0*	2,28 ± 0,38*	8,5x10 ⁻⁴ ± 8x10 ⁻⁵ *
GST-GCK(L184I) (n=6)	60,7 ± 1,6*	1,48 ± 0,03*	15,2 ± 0,7*	0,65 ± 0,08*	0,17±0,02*
GST-GCK(L184I/G193R/A201P) (n=4)	0,1 ± 0,0*	1,10 ± 0,16*	140,0 ± 3,9*	0,69 ± 0,10*	2,3x10 ⁻⁵ ± 1,7x10 ⁻⁶ *
GST-GCK(G193R) (n=6)	11,6 ± 1,8*	1,18 ± 0,06*	11,4 ± 1,1*	0,85 ± 0,06*	0,17 ± 0,03*
GST-GCK(A201P) (n=6)	2,2 ± 0,3*	1,42 ± 0,10*	93,4 ± 20,4*	0,79 ± 0,11*	6x10 ⁻⁵ ± 3x10 ⁻⁶ *
GST-GCK(A201T) (n=6)	36,1 ± 3,7*	1,32 ± 0,08*	13,6 ± 0,9*	0,54 ± 0,021*	0,25 ± 0,07*
GST-GCK(G246R) (n=6)	41,8 ± 2,3*	1,58 ± 0,12	14,8 ± 0,6*	0,64 ± 0,06*	0,10 ± 0,02*
GST-GCK(G328V) (n=6)	24,7 ± 0,9*	1,24 ± 0,02*	16,9 ± 0,5*	0,72 ± 0,07*	0,13 ± 0,01*
GST-GCK(S373K/V374M)	INSOLUBLE				
GST-GCK(D409N) (n=7)	5,3 ± 0,5*	1,13 ± 0,13*	5,1 ± 0,3*	1,44 ± 0,14*	0,33 ± 0,09*

Figura 13 (Página siguiente). Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las proteínas GST-GCK silvestre y mutantes. Diluciones de proteína a 0,25 mg/ml en tampón de congelación (glicerol al 30%, glucosa 50 mM, glutatión 10 mM, DTT 5 mM, KCl 200 mM y Tris/HCl 50 mM (pH 8)) fueron incubadas a diferentes temperaturas durante 30 min, previo a la medida de actividad enzimática a 30°C, en un lector de microplacas *Varioskan Flash Multimode Reader*. Se muestran las medias \pm SD de al menos 4 ensayos independientes. A) Representación de los resultados de los mutantes V55A, L184I, G193R y A201P. B) Representación de los resultados de los mutantes A201T, G246R y G328V. C) Representación de los resultados de los mutantes W99C, A176E y D409N. (*) Se consideraron diferencias significativas respecto a la proteína de referencia GST-GCK valores de $p < 0,05$ según el test *U* de *Mann–Whitney*.



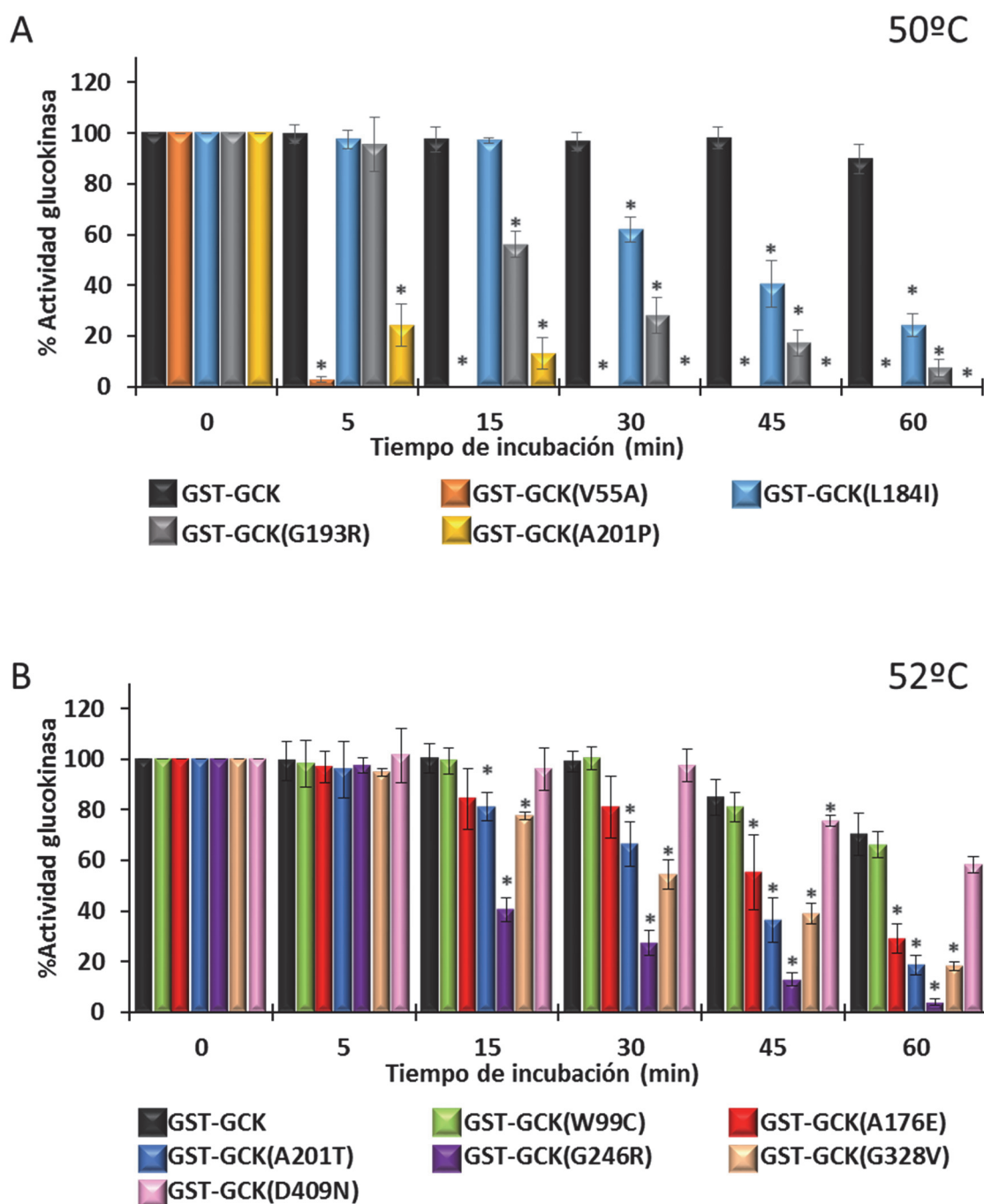


Figura 14. Cinética de inactivación de la actividad enzimática de las proteínas GST-GCK silvestre y mutantes a temperaturas elevadas. Diluciones de proteína a 0,25 mg/ml en tampón de congelación (glicerol al 30%, glucosa 50 mM, glutatión 10 mM, DTT 5 mM, KCl 200 mM y Tris/HCl 50 mM (pH 8)) fueron incubadas durante tiempos comprendidos entre 0 y 60 minutos a 50°C (A) o 52°C (B), antes de llevar a cabo la medida de actividad enzimática a 30°C en un lector de microplacas *Varioskan Flash Multimode Reader*. Los datos muestran las medias \pm SD de al menos 4 ensayos independientes. (*) Se consideraron diferencias significativas respecto a la proteína de referencia GST-GCK valores de $p < 0,05$ según el test *U* de *Mann–Whitney*.

1.5 Efecto de las mutaciones del residuo Ala201 en la interacción de la glucokinasa con su proteína reguladora GKR.

Como se ha mostrado en los apartados anteriores, dos de las mutaciones MODY2 sobre las que hemos realizado el análisis cinético implican cambios del residuo de alanina en posición 201 a treonina y prolina (A201T y A201P). Además, se han descrito otras familias MODY2 donde el residuo Ala201 está mutado a serina (A201S) (60). La Ala201 está localizada en la región bisagra de la GCK, formando parte del bolsillo hidrofóbico que permite el cambio conformacional de la GCK durante la catálisis y contigua a residuos que forman la superficie de contacto de la GCK con su proteína reguladora GKR (77, 130, 131). Por ello nos propusimos estudiar el posible efecto de las mutaciones del residuo Ala201 sobre la interacción de la enzima con su proteína reguladora.

1.5.1 Ensayo de doble híbrido para analizar el efecto de las mutaciones A201T y A201P sobre la interacción GCK-GKR.

Para estudiar el efecto de las mutaciones A201T y A201P sobre la interacción de la GCK con la GKR se llevaron a cabo experimentos de doble híbrido en levadura. Se introdujeron las correspondientes mutaciones en un plásmido que expresaba el cDNA de la glucokinasa fusionado al dominio de activación transcripcional de Gal-4 (GAD) y se transformó la cepa Y187 de *S. cerevisiae* con estos plásmidos, junto a otro que expresaba el cDNA de la GKR humana fusionado al dominio de unión a DNA de Gal-4 (GBD), tal y como se indica en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos. Se valoró la actividad β -galactosidasa mediante ensayos en filtro en al menos ocho transformantes independientes. Los resultados se muestran en la Figura 15 indican que las mutaciones

en el residuo Ala201 impiden la interacción proteína-proteína de la GCK con su proteína reguladora GKR. P.

1.5.2 Efecto de las mutaciones del residuo Ala201 sobre la sensibilidad de la glucokinasa a la inhibición de su actividad por GKR-Flag.

Como se ha descrito en la Introducción, la GKR actúa como un inhibidor de la actividad glucokinasa (12). Para comprobar si el impedimento de interacción física de la GCK con la GKR causado por las mutaciones en el residuo Ala201 era acompañado de una disminución en la inhibición causada por la proteína reguladora en la actividad glucokinasa, se valoró la actividad enzimática en presencia de GKR-Flag.

1.5.2.1 Purificación de la proteína reguladora de la glucokinasa humana GKR-Flag.

La proteína reguladora de la glucokinasa humana fusionada al epítopo Flag-M2 (GKR-Flag) se purificó de la cepa BL21 de *E. coli* transformada con el plásmido pFlagCTC-GKR. Se realizaron dos purificaciones independientes de GKR-Flag siguiendo el protocolo que se puso a punto en este trabajo y que se describe en el apartado 2.4.4 de Materiales y Métodos. Los rendimientos de purificación fueron de 1,4 y 1,2 mg de proteína por litro de cultivo de partida, respectivamente. La pureza, así como la integridad de la proteína purificada se comprobó mediante SDS-PAGE (Figura 16).

1.5.2.2 Inhibición de la actividad enzimática de GST-GCK(A201T) por GKR-Flag.

Se realizaron medidas de actividad glucokinasa a distintas concentraciones de GKR-Flag y en presencia de sorbitol 6-fosfato (S6P). En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos para las proteínas GST-GCK y GST-GCK(A201T). Además, en estos ensayos se incluyó como control la proteína mutante GST-GCK(A456V), de la que se ha

descrito que presenta una menor sensibilidad a la inhibición enzimática ejercida por la GKRP (211). Los ensayos no pudieron realizarse con el mutante GST-GCK(A201P), debido a su baja constante catalítica (Tabla 7). Mientras que la proteína de referencia GST-GCK era inhibida a todas las concentraciones de GKRP-Flag ensayadas, hasta reducirse al 10% en presencia de 200 nM de GKRP-Flag, las proteínas mutantes apenas se inhibían. Así, a la concentración de 200 nM las proteínas mutantes GST-GCK(A201T) y GST-GCK(A456V) mantenían cerca del 70 y 80% de actividad respectivamente. Nuestros resultados indican que la mutación A201T al igual que la mutación A456V, disminuye drásticamente la sensibilidad de la glucokinasa a su inhibición por GKRP.

1.6 Identificación de otras mutaciones MODY2 que implican pérdida de interacción de la glucokinasa con la GKRP.

Paralelamente a este trabajo, en nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo un estudio para identificar mutaciones en residuos de la glucokinasa que causan pérdida de interacción con la proteína reguladora GKRP. Ese estudio ha dado lugar a la identificación de una serie de mutaciones de la glucokinasa, entre las cuales una afecta al mismo residuo Ala201 (A201V) y otra al residuo Thr60 (T60A) (O. Vincent, M.A. Navas y colaboradores, sin publicar). El residuo Thr60 se encuentra muy cercano a la Ala201 en la estructura tridimensional de la proteína y, al igual que esta, cercano a residuos que forman parte de la superficie de contacto con la GKRP (Figura 18) (130, 131). Además, también está afectado por mutaciones MODY2 (197). Por esta razón decidimos incorporar a este trabajo el estudio funcional de las mutaciones MODY2 T60I y A201S, descritas en la literatura pero no caracterizadas funcionalmente (60, 197).





Fusión al dominio de unión a DNA de Gal4 (GBD)	Fusión al dominio de activación transcripcional de Gal4 (GAD)	Interacción de doble híbrido (Ensayo en filtro de β -galactosidasa)
GKRP	-----	
GKRP	GCK	
GKRP	GCK(A201T)	
GKRP	GCK(A201P)	

Figura 15. Interacción entre la GCK y la GKRP mediante ensayo de doble híbrido en levadura. La interacción entre el híbrido del dominio de unión a DNA de Gal4(GBD)-GKRP y el dominio de activación transcripcional de Gal4(GAD)-GCK silvestre y mutantes, se estudió en la cepa Y187 de *Saccharomyces cerevisiae*. Los experimentos en filtro se llevaron a cabo con al menos ocho transformantes independientes para cada caso. En los experimentos control, el híbrido GBD-GKRP no interaccionó con GAD y el híbrido GAD-GCK no interaccionó con GBD (no mostrado). Además se comprobó que las mutaciones no afectan a la estabilidad de las proteínas de fusión (no mostrado).

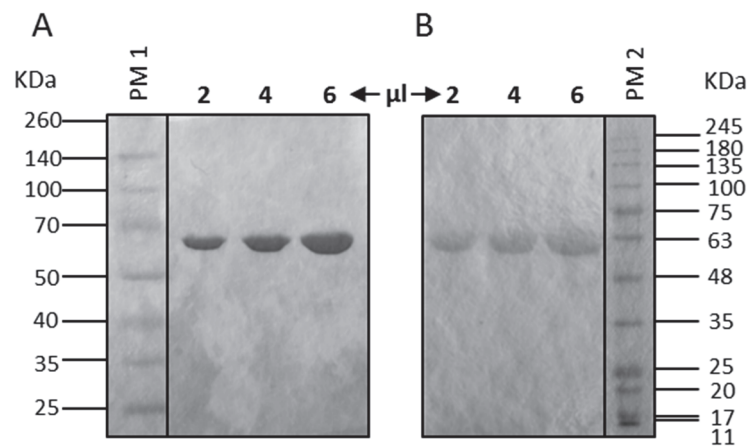


Figura 16. Proteína GGRP-Flag purificada. Se muestra el resultado de dos purificaciones independientes (A y B) de la proteína GGRP-Flag tras someter 2, 4 y 6 µl del eluido final la proteína a SDS-PAGE al 10%. A) Concentración de proteína en el eluido 2,5 mg/ml y tinción con coomasie. B) Concentración de proteína en el eluido 2,1 mg/ml y tinción con *BlueSafe*. PM 1: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder. PM 2: NZYColour Protein Marker II.

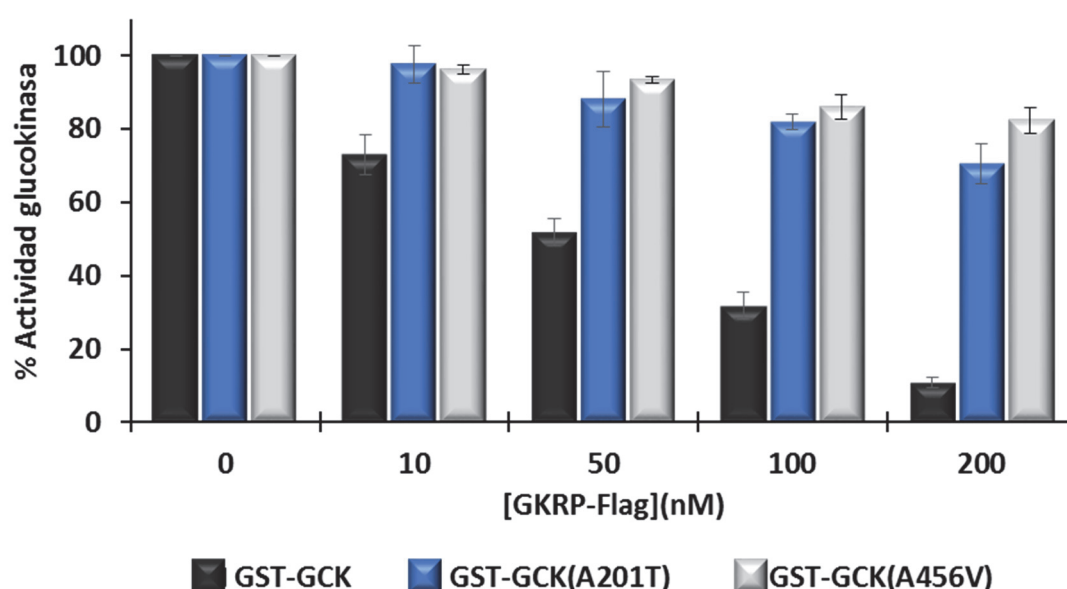


Figura 17. Efecto inhibitorio de la proteína GGRP-Flag purificada sobre la actividad glucokinasa de las GST-GCK silvestre y mutantes. El ensayo se realizó en un volumen final de 50 μ l, a 30°C, en un espectrofotómetro UVIKONxl (*Secomam*), en presencia de S6P 10 μ M, glucosa 5 mM y las concentraciones indicadas de GGRP-Flag. Los valores representados corresponden a la media \pm SD de los valores obtenidos en al menos seis valoraciones independientes de cada proteína. Para ambos mutantes, se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a la proteína de referencia GST-GCK a concentraciones de GGRP-Flag superiores a 10 nM, mediante el test *U* de *Mann-Whitney*.

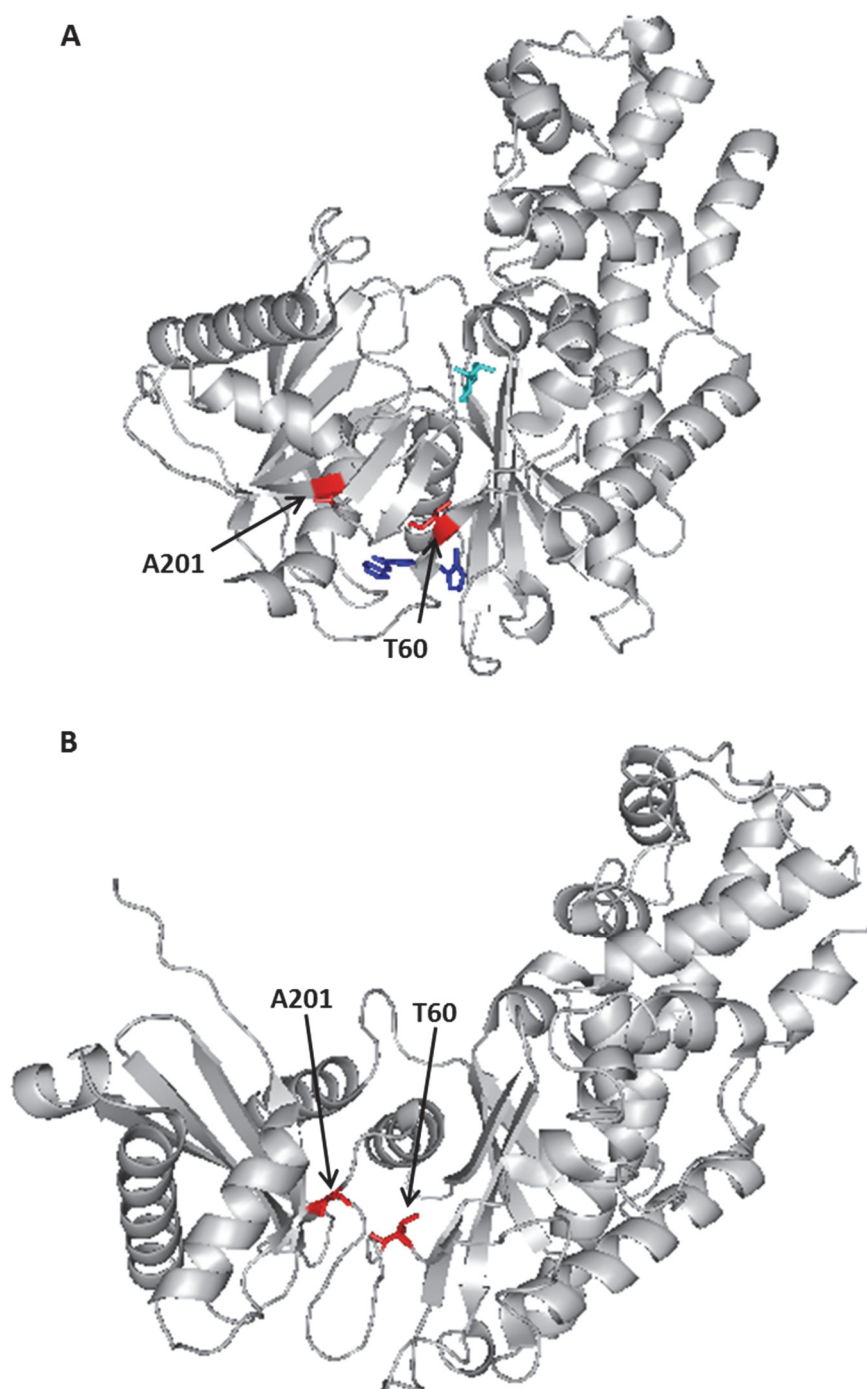


Figura 18. Ubicación de los residuos Thr60 y Ala201 en el modelo estructural de la GCK. Las estructuras proteicas (PDB, códigos IV4S, conformación cerrada y IV4T, conformación super-abierta) se han representado utilizando el programa *PyMOL*. Los residuos mutados identificados como causa de diabetes MODY2 se muestran en rojo. A) Conformación cerrada, en cian está representada la molécula de glucosa y en azul oscuro el GKA MRK. B) Conformación super-abierta.

1.6.1 Caracterización funcional de las mutaciones MODY2 T60I y A201S.

A continuación procedimos a evaluar el efecto de estas mutaciones sobre la actividad catalítica de la enzima.

1.6.1.1 Purificación de los mutantes GCK-GCK(T60I) y GST-GCK(A201S).

Las proteínas mutantes GST-GCK(T60I) y GST-GCK(A201S) se expresaron y purificaron siguiendo la misma estrategia que la utilizada para las mutaciones MODY2 analizadas anteriormente (apartado 1.2 de la sección de Resultados). En ambos casos se observó una única banda de aproximadamente 75 KDa tras someter las preparaciones a SDS-PAGE y posterior tinción con *BlueSafe* (Figura 19). El rendimiento de la purificación fue alrededor de un 40% menor para el mutante GST-GCK(T60I) que para la proteína de referencia, no detectándose diferencias significativas en el caso del mutante GST-GCK(A201S) (Tabla 8).

1.6.1.2 Análisis cinético de los mutantes GST-GCK(T60I) y GST-GCK(A201S).

Como se refleja en la Tabla 9, las mutaciones T60I y A201S ejercen un efecto negativo sobre la actividad catalítica de la GCK. Ambas mutaciones reducen significativamente el valor de la constante catalítica K_{cat} y aumentan las constantes de afinidad para ambos sustratos, $S_{0,5}$ y K_m . El efecto más drástico es el causado por la mutación T60I que conserva menos del 1% de actividad enzimática, mientras la proteína GST-GCK(A201S) mantiene cerca del 20% de actividad ($I_{ar} = 5,1 \times 10^{-3}$ y 0,19 respectivamente).

1.6.1.3 Análisis de la estabilidad de los mutantes GST-GCK(T60I) y GST-GCK(A201S) en función de la temperatura.

El análisis de la estabilidad de las proteínas GST-GCK portadoras de las mutaciones T60I y A201S se realizó de igual manera que en los casos anteriores (apartado 1.4 de Resultados). Como se muestra en la Figura 20, la actividad de las proteínas mutantes GST-GCK(T60I) y GST-GCK(A201S) es más sensible a los incrementos de temperatura que la de la proteína de referencia. Aunque ambos mutantes son estables a 37°C, la proteína GST-GCK(T60I) pierde el 50% de su actividad tras la incubación a 42°C, mientras que el mutante GST-GCK(A201S) lo hace a 50°C (Figura 20A). La cinética de inactivación a 50°C confirmó la inestabilidad de ambos mutantes (Figura 20B).

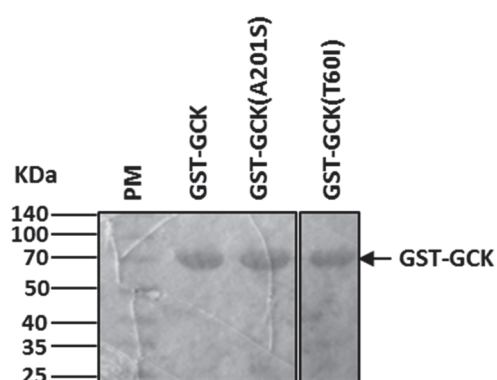


Figura 19. Proteínas de fusión GST-GCK, GST-GCK(T60I) y GST-GCK(A201S) purificadas. Se muestra una figura representativa correspondiente a cada una de las proteínas purificadas junto al patrón de peso molecular, tras ser sometidas a SDS-PAGE al 10% y tinción con *BlueSafe* como se describen en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. PM: marcador de peso molecular *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*.

Proteína	Rendimiento proteico (mg/L)
GST-GCK	4,6 ± 1,6
GST-GCK(T60I)	2,7 ± 0,4*
GST-GCK(A201S)	3,2 ± 0,3

Tabla 8. Rendimiento de purificación de las proteínas GST-GCK, GST-GCK(T60I) y GST-GCK(A201S). Los resultados se muestran como media ± SD de los valores obtenidos en al menos tres purificaciones independientes. Los datos se expresan en miligramos de proteína obtenida por litro de cultivo de partida. La concentración de proteína se determinó mediante el *kit Bio-Rad Protein Assay*. Para facilitar la comparación, el dato correspondiente a la proteína de referencia (GST-GCK) es el mismo que el presentado en la Tabla 6. (*) Se consideraron diferencias significativas respecto a la proteína silvestre valores de $p < 0,05$ mediante el método estadístico *T de Student*.

Proteína	Kcat (s ⁻¹)	h	S _{0,5} para Glucosa (mM)	Km para ATP (mM)	Iar
GST-GCK (n=23)	71,9 ± 7,3	1,62 ± 0,05	7,5 ± 0,40	0,47 ± 0,04	1 ± 0
GST-GCK(T60I) (n=6)	7,2 ± 0,4*	1,27 ± 0,07	36,9 ± 1,24*	1,09 ± 0,29*	5,1x10 ⁻³ ± 5x10 ⁻⁴ *
GST-GCK(A201S) (n=6)	21,2 ± 2,2*	1,44 ± 0,03*	9,9 ± 0,65*	0,82 ± 0,07*	0,19 ± 0,01*

Tabla 9. Parámetros cinéticos de las proteínas GST-GCK(T60I) y GST-GCK(A201S). Los ensayos fueron llevados a cabo en un lector de microplacas *Varioskan Flash Multimode Reader* y los parámetros cinéticos calculados como se describe en el apartado 2.7.1 de Materiales y Métodos. El índice de actividad de cada mutante fue referido al de la proteína de referencia GST-GCK para obtener los valores de Índice de actividad relativo (Iar). Los datos se expresan como media ± SD de 6 valoraciones de proteínas procedentes de al menos tres purificaciones independientes. Notese que los datos correspondientes a la proteína de referencia GST-GCK muestran las medias obtenidas en los experimentos llevados a cabo en este apartado y los mostrados en el apartado 1.3 (Tabla 7). El coeficiente de Hill (h) y el Iar carecen de unidades. (*) Se consideraron diferencias significativas valores de $p < 0,05$. Se utilizó el test *U* de Mann–Whitney en el caso de Iar y el *T* de Student para el resto de los parámetros.

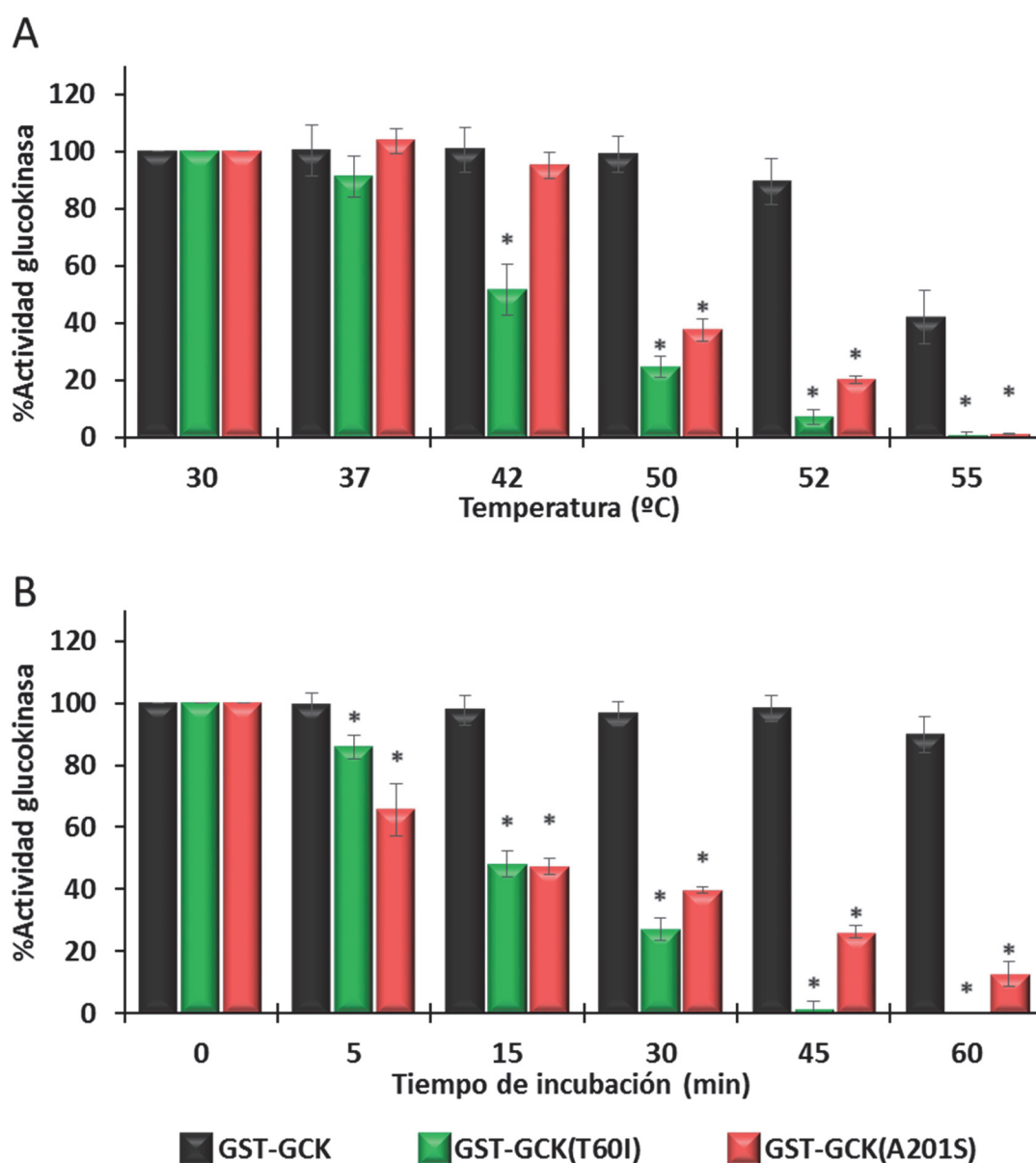


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las proteínas GST-GCK silvestre y mutantes. Diluciones de proteína a 0,25 mg/ml en tampón de congelación (glicerol al 30%, glucosa 50 mM, glutatión 10 mM, DTT 5 mM, KCl 200 mM y Tris/HCl 50 mM (pH 8)) fueron incubadas a diferentes temperaturas durante 30 min (A) o a 50°C durante distintos tiempos (B). En ambos casos se realizaron los ensayos de actividad enzimática a 30°C, en un lector de microplacas *Varioskan Flash Multimode Reader*. Los datos representados corresponden a las medias \pm SD de al menos 4 valoraciones independientes. (*) Se consideraron diferencias significativas respecto a la proteína de referencia GST-GCK valores de $p < 0,05$ mediante el test *U* de Mann–Whitney.

1.6.2 Efecto de las mutaciones T60I y A201S sobre la interacción de la glucokinasa con su proteína reguladora GKRP.

Para investigar el efecto de las mutaciones T60I y A201S sobre la interacción entre la GCK y la GKRP se llevaron a cabo experimentos de doble híbrido en levadura y ensayos de actividad glucokinasa en presencia de GKRP-Flag, como se describió anteriormente en el apartado 1.5 de Resultados.

La actividad β -galactosidasa obtenida de los ensayos de doble híbrido y valorada en ensayos en filtro se muestra en la Figura 21. La mutación A201S disminuye la intensidad de interacción del ensayo en filtro, mientras que la mutación T60I impide la interacción entre las dos proteínas.

La Figura 22 muestra los resultados de los ensayos de inhibición de la actividad glucokinasa de las proteínas GST-GCK(T60I) y GST-GCK(A201S) por GKRP-Flag, utilizando como controles las proteínas GST-GCK y GST-GCK(A456V). Ambos mutantes mostraron menor sensibilidad a la inhibición por GKRP-Flag que la proteína de referencia GST-GCK, ya que en presencia de 200 nM de GKRP-Flag el mutante GST-GCK(T60I) mantenía más del 65% de actividad y GST-GCK(A201S) conservaba cerca del 50% de actividad.





Fusión al dominio de unión a DNA de Gal4 (GBD)	Fusión al dominio de activación transcripcional de Gal4 (GAD)	Interacción de doble híbrido (Ensayo en filtro de β -galactosidasa)
GKRP	-----	
GKRP	GCK	
GKRP	GCK(T60I)	
GKRP	GCK(A201S)	

Figura 21. Interacción entre la GCK y la GKRP mediante ensayo de doble híbrido en levadura. La interacción entre el híbrido del dominio de unión al DNA de Gal4(GBD)-GKRP y el dominio de activación transcripcional de Gal4(GAD)-GCK silvestre y mutantes, se estudió en la cepa Y187 de *Saccharomyces cerevisiae*. Los experimentos en filtro se llevaron a cabo con al menos ocho transformantes independientes para cada caso. En los experimentos control, el híbrido GBD-GKRP no interaccionó con GAD y el híbrido GAD-GCK no interaccionó con GBD (no mostrado). Además, se comprobó que las mutaciones no afectan a la estabilidad de las proteínas de fusión (no mostrado).

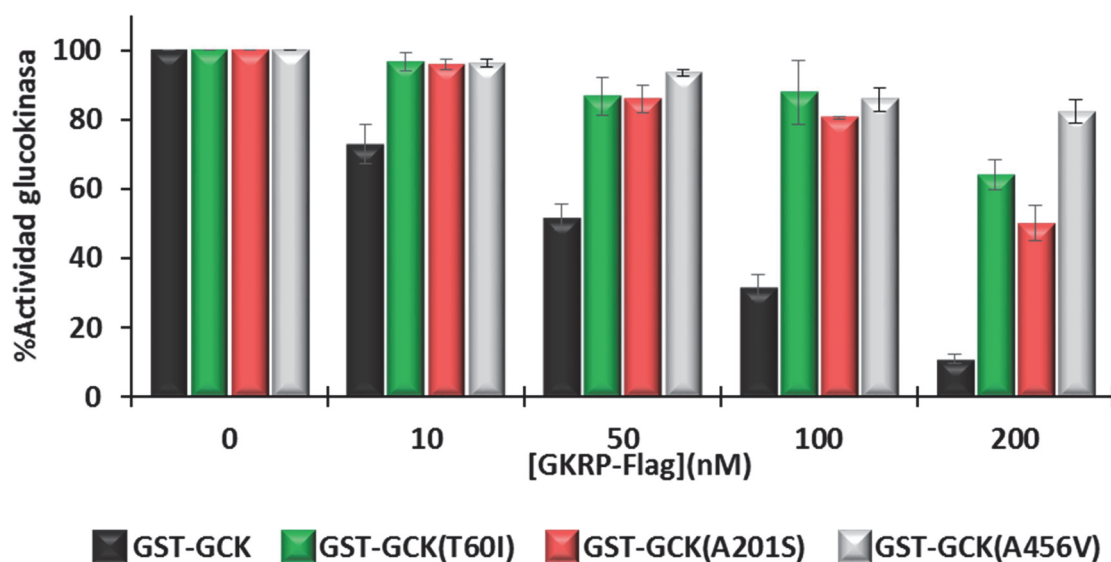


Figura 22. Efecto inhibitorio de la GKR-Flag purificada sobre la actividad enzimática de GST-GCK(T60I) y GST-GCK(A201S). El ensayo se realizó en un volumen final de 50 μ l a 30°C en un espectrofotómetro UVIKONxl (*Secomam*), en presencia de S6P 10 μ M, glucosa 5 mM y las concentraciones indicadas de GKR-Flag. Se representan las medias \pm SD de los valores obtenidos en al menos seis valoraciones independientes de cada proteína. Para todos los mutantes ensayados se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a la proteína de referencia GST-GCK a concentraciones de GKR-Flag superiores a 10 nM, mediante el test *U* de *Mann–Whitney*.

1.7 Localización subcelular de los mutantes MODY2 de pérdida de interacción con GKR.

Como se ha descrito en la Introducción, la unión de la GKR a la glucocinasa, además de inhibir la actividad de la enzima, produce su translocación al núcleo celular. Por ello, a continuación nos propusimos analizar si los efectos observados en los ensayos de doble híbrido y de inhibición enzimática para los mutantes de glucocinasa localizados en los residuos Thr60 y Ala201, se correspondían con un efecto en la localización núcleo-citoplásmica de la GCK. Con este fin se contranfectaron células HepG2 con los plásmidos pEGFPC3-GCK silvestre y mutantes, que expresan las correspondientes proteínas de fusión GFP-GCK, junto con el plásmido pmCherry-GKR que expresa la GKR humana fusionada a la proteína fluorescente mCherry. Como control adicional se analizó la localización subcelular de las proteínas expresadas desde los plásmidos pEGFPC3-GCK(A201V) y pEGFPC3-GCK(T60A), cuyas mutaciones habían sido identificadas previamente por nuestro grupo (apartado 1.6 de Resultados). La expresión de las proteínas en las células transfectadas se confirmó mediante *western blot* (Figura 23) y la localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-GCK y GKR-mCherry fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia (Figura 24; Tabla 10).

Como se muestra en la Figura 24, la fluorescencia de la GFP libre es detectada principalmente en el núcleo celular, tanto en presencia como en ausencia de GKR-mCherry. Sin embargo, la fluorescencia de la fusión GFP-GCK se acumula en el citoplasma de las células que no expresan GKR-mCherry. Por el contrario, cuando la GFP-GCK es coexpresada con la proteína GKR-mCherry la mayoría de las células la acumulan en el núcleo, confirmando las observaciones descritas previamente de que la glucocinasa es

detectada en el núcleo de las células HepG2 sólo en presencia de GKRP (149). Por su parte, la fluorescencia roja de la proteína mCherry y de la fusión GKRP-mCherry es detectada principalmente en el núcleo de las células HepG2, independientemente de la coexpresión de GFP-GCK.

La mayoría de las células que expresan las proteínas GFP-GCK mutantes para los residuos Thr60 y Ala201 acumulan estas en el citoplasma, aún en presencia de GKRP-mCherry (Figura 24). Si bien el mutante GFP-GCK(A201S), a diferencia de los demás, se acumula en el núcleo en el 26% de células que coexpresan GKRP-mCherry (Tabla 10). Estos resultados indican que las mutaciones en los residuos Thr60 y Ala201 de la glucokinasa interfieren en su interacción con la proteína reguladora GKRP y así en su translocación al núcleo celular.

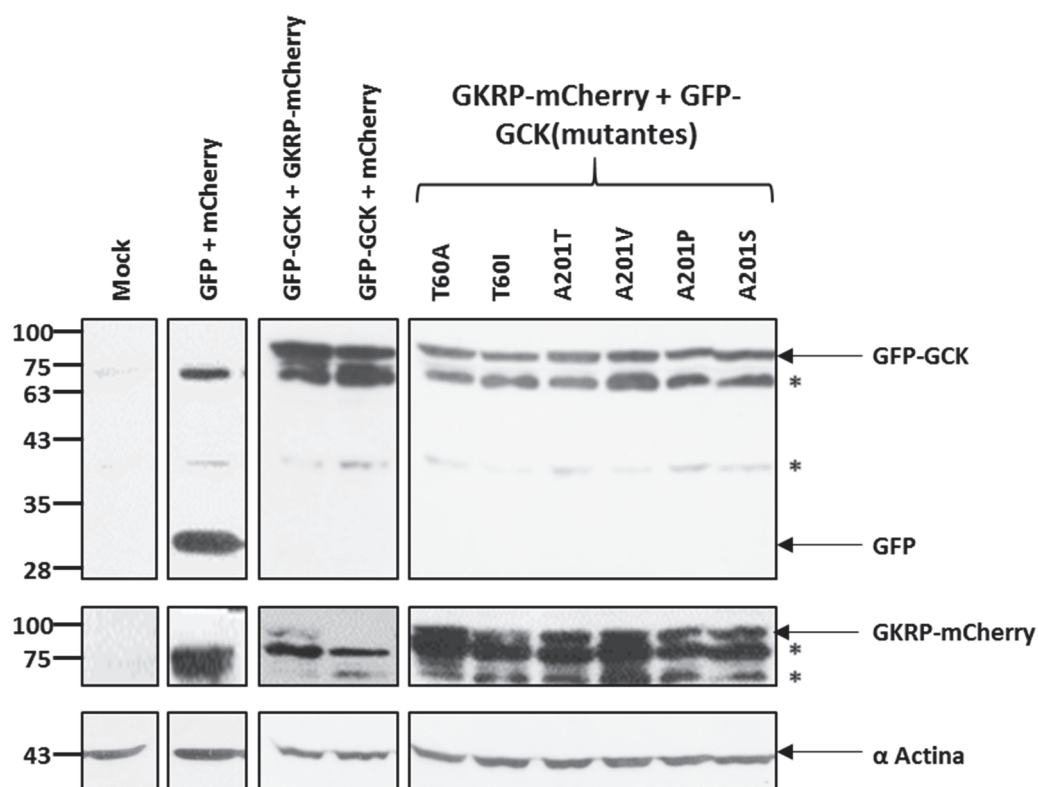


Figura 23 (Página siguiente). Inmunodetección mediante *western blot* de las proteínas GFP-GCK (silvestre y mutantes) y GGRP-mCherry. Células HepG2 fueron cotransfectadas con 2 μ g de los plásmidos pEGFPC3 y pEGFPC3-GCK silvestre y mutantes y 6 μ g de los plásmidos pmCherry o pmCherry-GGRP. Transcurridas 42 horas, se recogieron y lisaron como se indica en el apartado 2.10 de Materiales y Métodos. Las preparaciones se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios *rabbit anti GFP-Nter*; *Polyclonal anti DS-Red* y *Monoclonal Mouse Anti-Actin*, respectivamente. Se utilizaron los correspondientes anticuerpos secundarios *Goat anti rabbit-HRP*; *Goat anti rat-HRP*; *ECL anti Mouse IgG, HRP-linked*, respectivamente. En cada carril se indica las proteínas expresadas tras la transfección. Mock: Células no transfectadas. Las flechas señalan las bandas correspondientes a las proteínas indicadas. Los asteriscos señalan bandas inespecíficas.

Figura 24 (Página siguiente). Localización subcelular de las proteínas GFP y GFP-GCK silvestre y mutantes en células HepG2 que coexpresan mCherry o GGRP-mCherry. Las células adheridas a cubreobjetos de vidrio fueron transfectadas transitoriamente, en placas multipocillos de 6 pocillos, con 1 μ g de los plásmidos pEGFPC3 o pEGFPC3-GCK correspondientes y 3 μ g de los plásmidos pmCherry o pmCherry-GGRP. Transcurridas 42 horas tras la transfección, las células fueron fijadas y los núcleos se tiñeron de azul con DAPI, como se describe en el apartado 2.11 de Materiales y Métodos. El análisis de la distribución de la fluorescencia se realizó con un microscopio de fluorescencia y la adquisición de imágenes con un microscopio con sistema confocal, como se indica en el apartado 2.13 de Materiales y Métodos. A y B) Se muestran imágenes representativas de células que expresan las proteínas indicadas. Las barras de escala situadas en las imágenes con DAPI corresponden a 10 μ m. C y D) Porcentaje de células que acumulan las fusiones a GFP (fluorescencia verde) en el citoplasma. Los datos representados se han extraído de la Tabla 10 y se muestran los valores medios \pm SD. C) Células que coexpresan mCherry con GFP o con la fusión GFP-GCK. D) Células que coexpresan GGRP-mCherry con GFP o con las fusiones GFP-GCK silvestre o mutantes. Para todos los mutantes se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de células con acumulación de fluorescencia verde en el citoplasma cuando se coexpresa GGRP-mCherry, respecto a la proteína de referencia GFP-GCK, considerando un valor de $p < 0,05$ obtenido mediante el test *T de Student*.

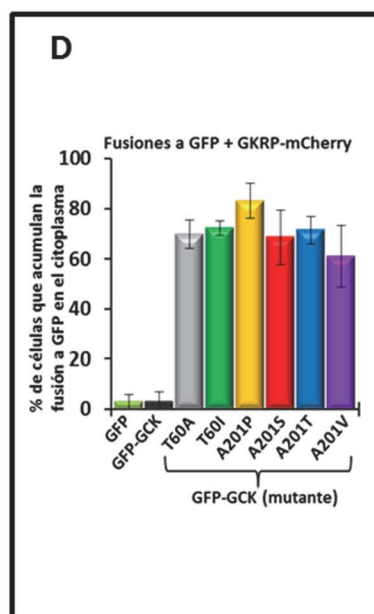
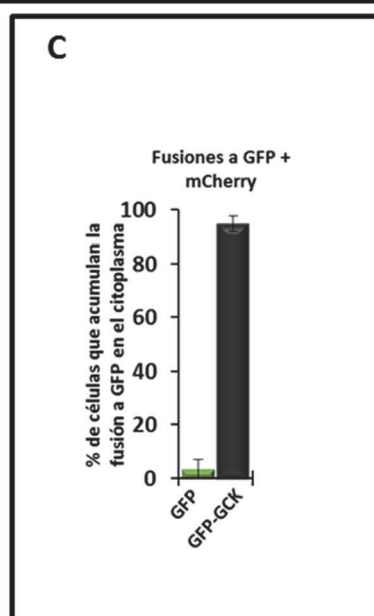
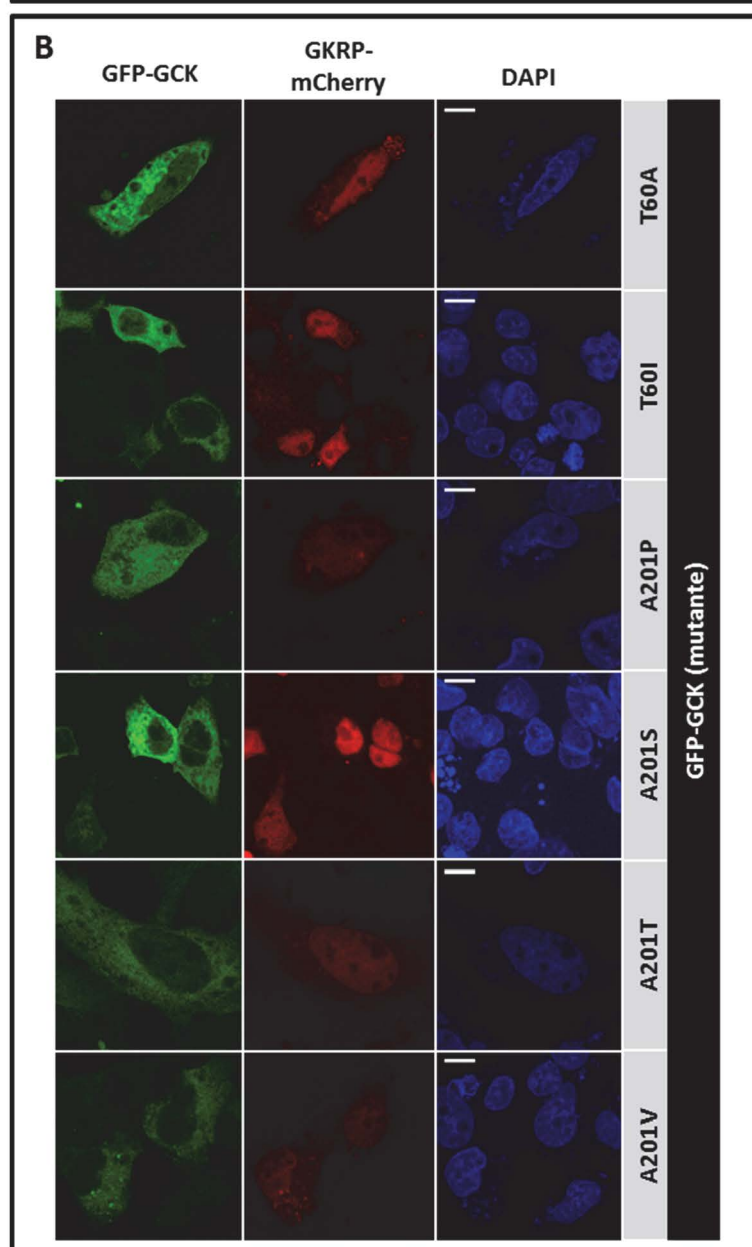
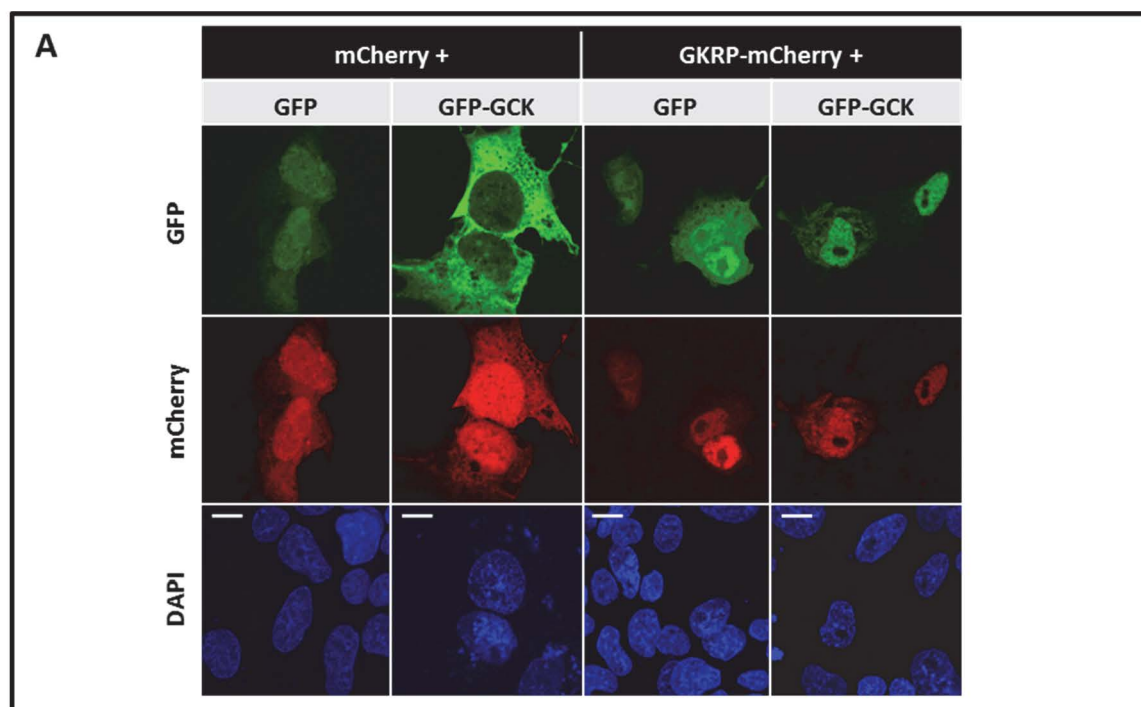


Tabla 10 (Página siguiente). Distribución de la fluorescencia de las fusiones a GFP y a mCherry en células HepG2. Las células fueron transfectadas y tratadas como se indicó en la Figura 24. El análisis visual de las células transfectadas se llevó a cabo mediante un microscopio de fluorescencia tal y como se indica en el apartado 2.13 de Materiales y métodos. La distribución de la fluorescencia en las células se clasificó en H: homogénea, N: predominantemente nuclear o C: predominantemente citoplásmica. Se muestran los valores medios \pm SD en porcentaje de células con la distribución indicada de la fluorescencia. Nº Células corresponde al número total de células analizadas en un mínimo de tres cotransfecciones independientes realizadas por duplicado. Solo se tuvieron en cuenta las células en las que se detectaban ambas fluorescencias, verde y roja. Notese que los datos presentados en las columnas controles referidos a GFP y GFP-GCK + mCherry o + GKRP-mCherry, reflejan las medias observadas en los experimentos mostrados en este apartado y los mostrados en el apartado 2.4.1 (Tabla 15). (*) Se consideraron diferencias significativas, al comparar los valores obtenidos frente a las células que expresaban la proteína GFP-GCK, valores de $p < 0,05$ mediante el test *T de Student*.

	Proteína	mCherry +		GKRP-mCherry +							
		Distribución (% de células)	GFP	GFP-GCK	GFP	GFP-GCK	GFP-GCK (mutantes)				
	T60A						T60I	A201P	A201S	A201T	A201V
Fluorescencia Verde	H	59,1 ± 5,9*	4,1 ± 2,5	64,3 ± 10,2*	31,1 ± 5,2	28,1 ± 5,5	22,5 ± 1,3*	13,8 ± 8,4	5,6 ± 3,3*	23,9 ± 6,5	36,6 ± 11,6
	N	37,5 ± 8,9*	1,0 ± 1,7	34,7 ± 10,0*	65,9 ± 3,6	2 ± 1,6*	5,3 ± 3,9*	2,9 ± 2,1*	25,7 ± 11,1*	4,6 ± 2,3*	2,5 ± 2,4*
	C	3,5 ± 3,5*	94,9 ±4,1	3,0 ± 2,8	3,1 ± 4,3	69,9 ± 5,5*	72,2 ± 2,9*	83,3 ± 7,0*	68,7 ± 10,8*	71,5 ± 5,3*	61,0 ± 12,3*
Fluorescencia roja	H	40,5 ± 4,7	39,5 ± 3,9	42,4 ± 5,0	39,4 ± 10,4	44,5 ± 12,7	26,7 ± 8,2	39,7 ± 1,6	36,9 ± 5,5	50,7 ± 24,9	52,5 ± 11,7
	N	55,9 ± 5,4	59,3 ± 3,3	54,9 ± 5,5	58,6 ± 10,6	53,6 ± 13,2	70,5 ± 8,6	57,1 ± 1,3	59,8 ± 6,2	47,4 ± 23,9	39,8 ± 19,6
	C	3,6 ± 3,4	1,2 ± 0,8	2,7 ± 2,0	2,0 ± 2,9	1,9 ± 1,4	2,8 ± 1,3	3,2 ± 2,4	3,3 ± 2,5	1,9 ± 2,1	7,7 ± 8,2
	NºCélulas	813	1113	1434	1393	791	351	340	420	570	585

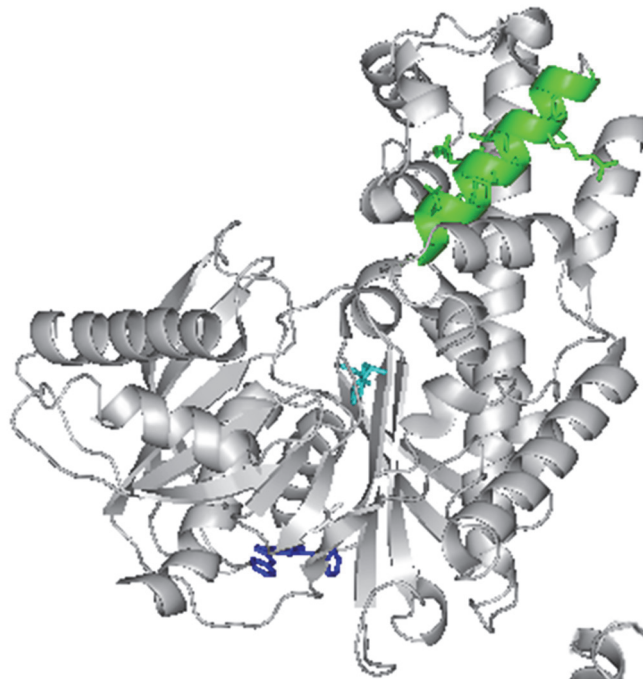
2 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES MODY2 LOCALIZADAS EN LA SEÑAL DE EXPORTACIÓN NUCLEAR (NES) DE LA GLUCOKINASA.

En apartados anteriores se han analizado mutaciones MODY2 que, interfiriendo en la interacción de la glucokinasa con su proteína reguladora, impiden o dificultan la entrada de la enzima al núcleo de la célula. Hemos querido complementar este estudio con el análisis de mutaciones MODY2 que pudieran afectar al proceso de exportación de la glucokinasa desde el núcleo al citoplasma por estar situadas en la secuencia de aminoácidos propuesta como señal de exportación nuclear (NES) de la enzima (137).

2.1 Ubicación de la señal de exportación nuclear en la estructura tridimensional de la glucokinasa y de las mutaciones analizadas.

Como se ha mencionado en la Introducción, la NES de la glucokinasa está localizada en la hélice α -8 y comprende los residuos de aminoácido que cubren las posiciones 300 a 310 (137) (Figura 25). Hemos caracterizado funcionalmente todas aquellas mutaciones MODY2, ubicadas en la secuencia NES de la glucokinasa que estaban descritas al inicio de este trabajo. Estas mutaciones se describen en el apartado 1.1 de Materiales y Métodos (Tabla 2) y son: E300K, E300Q, V302E, R303W, L304P, L306R, R308W, L309H y L309P. La posición de las mutaciones dentro de la secuencia NES y su conservación respecto al consenso se muestra en la Figura 26.

A



B

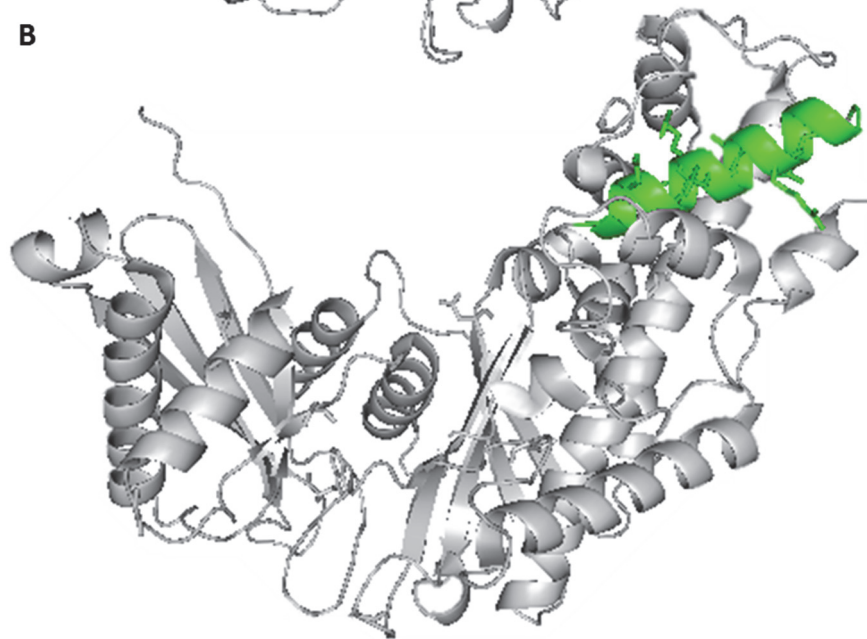


Figura 25. Localización de la secuencia NES en el modelo estructural de la GCK. Las estructuras proteicas (PDB, códigos IV4S, conformación cerrada y IV4T, conformación super-abierta) se han representado utilizando el programa *PyMOL*. La hélice α -8 y las cadenas laterales de los residuos afectados se muestran en verde. A) Conformación cerrada, en cian está representada la molécula de glucosa y en azul oscuro el GKA MRK. B) Conformación super-abierta.

NES

Consenso

HKK4_HUMAN 299

HKK4_RAT 299

HKK4_MOUSE 299

HKK4_XENLA 292

α-8

α-9

α-10

Figura 26. Comparación de la secuencia de aminoácidos 299 a 359 de la glucokinasa humana con otras glucokinosas para analizar la conservación de los residuos de la secuencia NES. Los números indican los aminoácidos en las secuencias polipeptídicas de las proteínas. En rojo se muestran los residuos afectados por las mutaciones MODY2. Nótese que la secuencia de la GCK humana contiene un residuo de Arg en posición 308 mientras que la gck de rata contiene un residuo de Lys en esa misma posición. Se indica la estructura secundaria de la proteína en hélices α (sombreado azul) y los cuatro residuos hidrofóbicos que conformarían la NES (sombreado amarillo).

2.2 Localización subcelular de la proteína ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP.

Para estudiar el efecto de las mutaciones sobre la actividad de la secuencia NES se utilizó el plásmido pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ que expresa una proteína de fusión que contiene los aminoácidos 299 a 359 de la glucokinasa de rata fusionados al extremo N-terminal la GFP (Figura 27). Debido a su pequeño tamaño (≈ 34 kDa), esta proteína de fusión entra por difusión en el núcleo sin requerimiento de GKR y había sido la utilizada en el trabajo original para identificar la secuencia NES de la glucokinasa (137). Se realizaron mutagénesis dirigidas en este plásmido para introducir los correspondientes cambios de aminoácidos y se transfectó la línea celular HEK293T con los plásmidos resultantes. Como controles adicionales se transfectaron células con los plásmidos pEGFPN2 que expresa la GFP libre, pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(K308R) que expresa la proteína de fusión donde la lisina 308 de la glucokinasa de rata se ha sustituido por arginina para obtener la secuencia de aminoácidos de la NES humana y pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3 que contiene la triple sustitución de las leucinas 306, 307 y 309 por alaninas que inactiva la NES (137). La expresión de las proteínas ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP silvestre y mutantes en las células transfectadas se confirmó mediante *western blot* (Figura 28).

La distribución e intensidad relativa de la fluorescencia en los compartimentos de las células transfectadas se analizó mediante microscopía de fluorescencia (Figuras 29 - 33 y Tablas 11 y 12).

Secuencia NES (300-310)	Proteína	Referencia
3 0 0 - E L V R L V L L K L V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ -GFP	(137)
3 0 0 - E L V R L V L L R L V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (K308R)-GFP (NES humano)	(García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168))
3 0 0 - E L V R L V A A K A V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ mt3-GFP	(137)
3 0 0 - K L V R L V L L K L V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (E300K)-GFP	Este trabajo
3 0 0 - Q L V R L V L L K L V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (E300Q)-GFP	Este trabajo
3 0 0 - E L E R L V L L K L V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (V302E)-GFP	(García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168))
3 0 0 - E L V W L V L L K L V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (R303W)-GFP	(García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168))
3 0 0 - E L V R P V L L K L V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (L304P)-GFP	Este trabajo
3 0 0 - E L V R L V R L K L V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (L306R)-GFP	Este trabajo
3 0 0 - E L V R L V L L W L V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (K308W)-GFP	(García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168))
3 0 0 - E L V R L V L L K P V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (L309P)-GFP	Este trabajo
3 0 0 - E L V R L V L L K H V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (L309H)-GFP	Este trabajo
3 0 0 - K L V R P V L L K P V - 3 1 0	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (E300K/L304P)-GFP	Este trabajo

Figura 27. Esquema de la proteína de fusión ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y mutantes. La proteína ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP contiene un fragmento de la glucokinasa de rata (aminoácidos 299 a 359, ver Figura 26) que incluye la secuencia NES (aminoácidos 300 a 310) fusionado al extremo N-terminal de la GFP. Se muestra la secuencia natural de la NES de la glucokinasa de rata, seguido del mutante K308R que genera la secuencia NES humana, el mutante mt3, y seguido a continuación de todos los mutantes construidos en este laboratorio, con indicación de las correspondientes referencias. Los residuos mutados aparecen en color rojo.

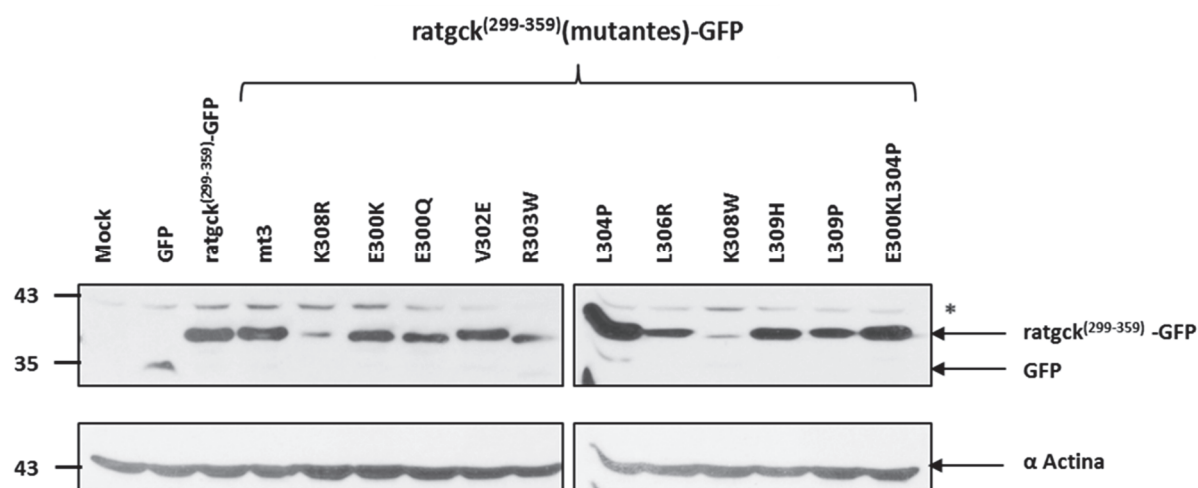


Figura 28. Inmunodetección mediante *western blot* de las proteínas GFP y ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP silvestre y mutantes. Células HEK293T fueron transfectadas con 1 µg de los plásmidos pEGFPN2, pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ y pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3. Transcurridas 42 horas desde la transfección, las células se recogieron y lisaron como se indica en el apartado 2.10 de Materiales y Métodos. Las preparaciones se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios *rabbit anti GFP-Nter* y *Monoclonal Mouse Anti-Actin*, respectivamente. Posteriormente se incubaron con sus correspondientes anticuerpos secundarios *Goat anti rabbit-HRP* y *ECL anti Mouse IgG, HRP-linked*. En cada carril se indica la proteína expresada tras la transfección. Mock: células no transfectadas. Las flechas señalan las bandas correspondientes a las proteínas indicadas. El asterisco señala bandas inespecíficas.

2.2.1 Confirmación de la presencia de una secuencia NES funcional en la proteína de referencia ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP.

Como se había observado anteriormente en nuestro laboratorio (García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168)), en la mayoría de las células transfectadas que expresan la proteína de fusión ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP, la fluorescencia se aprecia visualmente homogénea en el núcleo y el citoplasma (Figura 29A y Tabla 11), aunque su intensidad calculada es mayor en el citoplasma (intensidad relativa N/C = $0,76 \pm 0,1$; Figura 29A). Este resultado es el que cabría esperar de la presencia de una NES funcional, contrariamente a lo observado en las células que expresan la GFP libre o el mutante ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3-GFP, donde la mayoría de las células acumulan la fluorescencia en el núcleo (intensidad relativa N/C = $1,4 \pm 0,2$ y $1,6 \pm 0,4$ respectivamente; Figura 29A).

De manera complementaria, para confirmar la funcionalidad de la secuencia NES en nuestra proteína de referencia ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP, investigamos el efecto que provocaba sobre su localización núcleo-citoplásmica la sobreexpresión de la exportina 1/CRM1 o el tratamiento con leptomicina B, un inhibidor de ésta. Observamos que el tratamiento con leptomicina B produce una acumulación de la fluorescencia en el núcleo celular en más del 70% de las células que expresaban la proteína de referencia (intensidad relativa N/C = $1,5 \pm 0,3$; Figura 29B), mientras que en las células que expresan la GFP libre o el mutante mt3 la distribución de la fluorescencia no varía significativamente de la observada en ausencia de inhibidor (Figura 29B y Tabla 11).

Para analizar el efecto causado por la sobreexpresión de CRM1, se realizaron cotransfecciones de la línea celular HEK293T con los plásmidos pEGFPN2, pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ o pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3, junto con el plásmido pCMV-HA-CRM1. La

expresión de la exportina 1/ CRM1 se detectó mediante inmunocitoquímica, utilizando anticuerpos frente al epítipo HA acoplados al fluoróforo Texas Red. Se analizó la distribución subcelular de la fusión a GFP en aquellas células en las que se detectaba tanto fluorescencia verde como roja (Figura 29C). Observamos que la sobreexpresión de CRM1 no afecta significativamente a la localización de la GFP libre, pero provoca que la localización de la proteína *ratgck*⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP sea principalmente citoplásmica en la mayoría de las células ($76 \pm 1\%$; Intensidad relativa N/C = $0,53 \pm 0,1$; Figura 29C). Por el contrario, el porcentaje de células que acumulan el mutante mt3 en el citoplasma es inferior al 30%. Además, un porcentaje similar de células mantenía este mutante acumulado principalmente en el núcleo (Figura 29C y Tabla 11).

En su conjunto, estos resultados confirman la presencia de una secuencia NES funcional en la proteína de referencia *ratgck*⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP, significativamente inactivada en el mutante mt3.

2.2.2 Efecto de las mutaciones MODY2 en la localización subcelular de la proteína *ratgck*⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP.

El análisis de la distribución de la fluorescencia en las células HEK293T transfectadas con los plásmidos pEGFPN2-*ratgck*⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ que portan las correspondientes mutaciones MODY2 se muestra en las Figuras 30 a 33 y en la Tabla 12. Como ya se había observado previamente en nuestro laboratorio, el cambio K308R, para obtener la secuencia NES de la glucokinasa humana, no afecta a la funcionalidad de esta y la mayoría de las células que expresan las mutaciones V302E y R303W acumulan la fluorescencia principalmente en el núcleo celular (intensidad relativa N/C = $1,4 \pm 0,2$ en ambos casos; Figura 30C). Además corroboramos la presencia de un alto porcentaje de células (> 50%)

que acumulaban la fluorescencia de la proteína ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(K308W)-GFP en la región perinuclear (Figura 30C y Tabla 12) (García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168)).

Por otro lado, observamos que la mutación L306R provocaba la formación de agregados en la mayoría de las células (>65%), aunque en el resto, la distribución de la fluorescencia no variaba significativamente de la observada en el control (Figura 30 y Tabla 12). Un efecto similar observamos al expresar el mismo mutante en la línea celular COS-7 (Resultados no mostrados). La mayoría de las células que expresaban cualquiera de las mutaciones de la Leu309, L309H y L309P, mostraban una distribución de la fluorescencia homogénea (Intensidad relativa N/C \approx 1; Figura 30C). Por el contrario, las dos mutaciones que afectan al residuo Glu300, E300K y E300Q, provocaban la acumulación de la fluorescencia en el citoplasma (Intensidad N/C = $0,54 \pm 0,1$ y $0,51 \pm 0,03$ respectivamente; Figura 30C). Por último, más del 70% de las células que expresaban la mutación L304P acumulaban la fluorescencia en el núcleo (Intensidad relativa N/C = $1,63 \pm 0,2$; Figura 30C), de manera similar al mutante control mt3.

El tratamiento con leptomicina B provocó que la mayoría de las células acumularan la fluorescencia en el núcleo (Figura 31 y Tabla 12), aunque alrededor del 25% de las células que expresaban las mutaciones E300K y E300Q mantenían la fluorescencia principalmente en el citoplasma (Tabla 12). Como se refleja en los resultados mostrados en la Figura 32, la sobreexpresión de HA-CRM1 induce la acumulación de fluorescencia en el citoplasma en la mayoría de las células que expresan las distintas mutaciones, excepto L304P. En este caso, tan sólo el 29% de las células lo acumulan en el citoplasma, mientras que el 31% lo acumula principalmente en el núcleo, de manera similar a lo observado con el mutante control mt3 (Figura 32 y Tabla 12).

En conjunto, estos resultados indican que las mutaciones MODY2 localizadas en la secuencia NES de la glucokinasa alteran la actividad de la señal de exportación nuclear. Las mutaciones que afectan al glutamato 300 refuerzan la señal, mientras que las mutaciones de los residuos 302, 303, 304 y 309 la inactivan en distintos grados, siendo la mutación L304P la que ejerce un efecto mayor, similar al causado por el mutante control mt3.

2.2.3 Efecto de la mutación L304P en la localización subcelular de la proteína de fusión ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(E300K)-GFP.

Con el objetivo de confirmar el efecto inactivante de la mutación L304P sobre la secuencia NES de la glucokinasa, construimos un plásmido que portaba esta mutación junto con la mutación E300K, la cual habíamos observado que potenciaba la NES (Figura 30 y Tabla 12). Se transfectaron células HEK293T con el plásmido pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(E300K/L304P) y se analizó la distribución de la fluorescencia en las mismas condiciones descritas en los apartados anteriores. Observamos que la fluorescencia de la proteína doble mutante se acumula en el núcleo en la mayoría de las células transfectadas (Figura 33) y que, al igual que ocurría con los mutantes L304P y mt3, el 30% de las células mantenían la fluorescencia principalmente en el núcleo a pesar de la sobreexpresión de exportina 1/CRM1. Estos resultados confirmaban el efecto inactivador de la mutación L304P sobre la señal de exportación nuclear de la glucokinasa.

Figura 29 (Página siguiente). Localización subcelular de las proteínas GFP, ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3-GFP en células HEK293T. Las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio fueron transfectadas transitoriamente con 0,5 µg de los plásmidos pEGFPN2, pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ y pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3. Pasadas 42 horas, las muestras se prepararon para su análisis por microscopía de fluorescencia como se indica en el apartado 2.11 de Materiales y Métodos (A). B) Las células fueron incubadas en presencia de leptomicina B (LMB) 40 nM durante 6 horas. C) Las células fueron cotransfectadas con 1,5 µg del plásmido pCMV-HA-CRM1 y tratadas para la detección de HA-CRM1 mediante inmunotinción con TexasRed, como se indica en el apartado 2.10 de Materiales y Métodos. Los núcleos celulares se tiñeron de azul con DAPI. El análisis de la distribución de la fluorescencia verde se realizó utilizando un microscopio Leica DMRB. A la izquierda se muestran imágenes representativas de cada grupo de células adquiridas con un microscopio confocal LEICA DMIRE2. Las barras de escala mostradas en las imágenes de las tinciones con DAPI corresponden a 10 µm. En las gráficas centrales están representados los valores medios ± SD en porcentaje de células que presentaban acumulación de fluorescencia en el núcleo según datos extraídos de la Tabla 11. En las gráficas situadas a la derecha se muestran los valores medios ± SD de las relaciones de intensidad N/C, calculadas a partir de al menos 10 células de cada preparación, salvo para la GFP libre que se analizaron 7 células. (*) Se consideraron diferencias significativas, al comparar los valores obtenidos frente a las células que expresaban la proteína ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP, valores de $p < 0,05$ mediante el test *T de Student*.

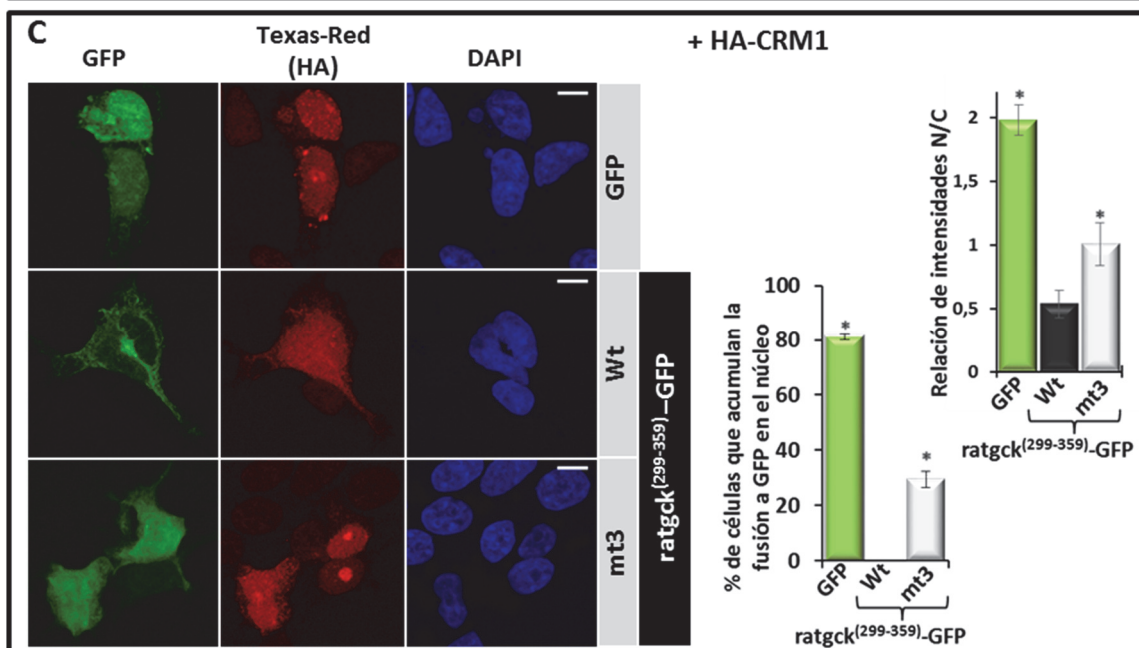
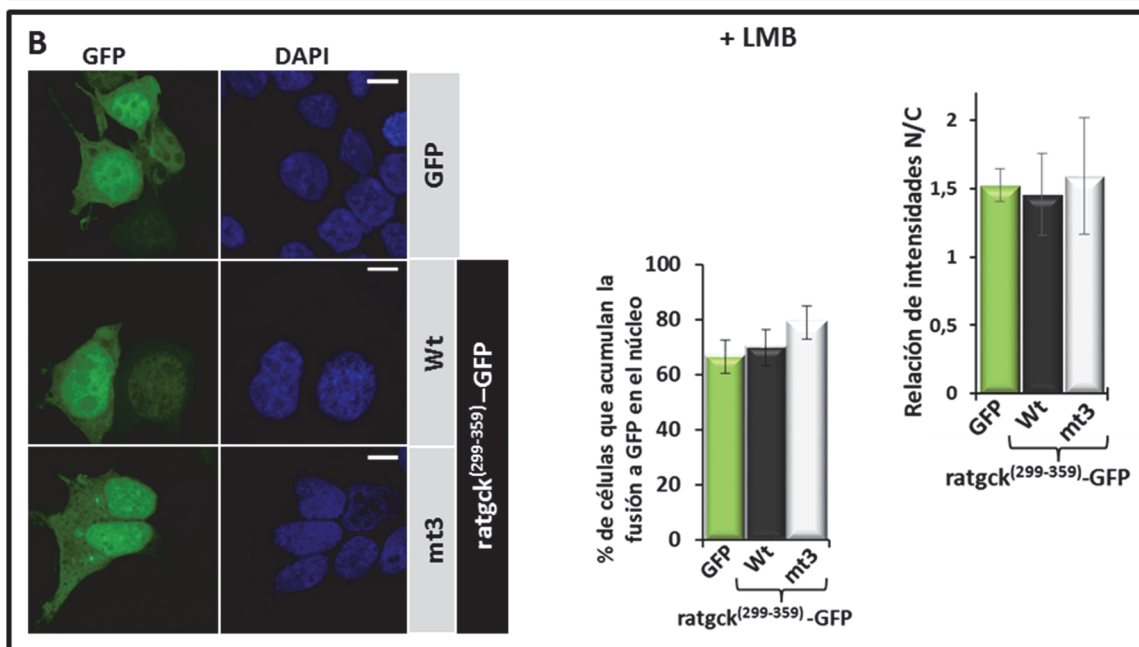
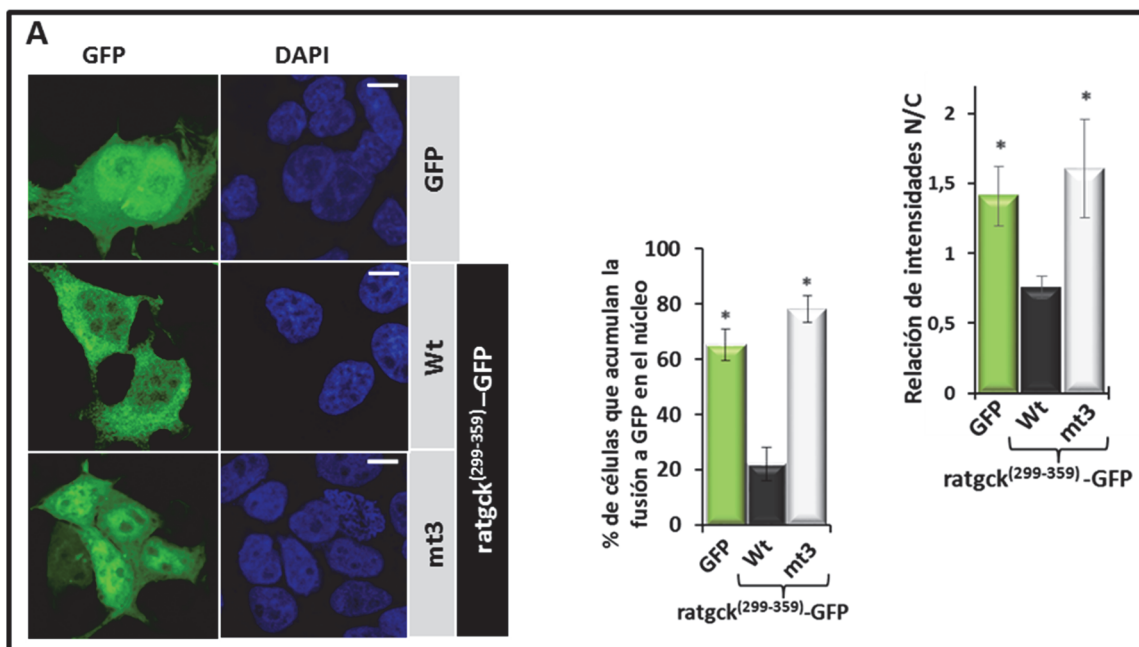


Tabla 11 (Página siguiente). Distribución subcelular de las proteínas GFP, ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾mt3-GFP en células HEK293T. Las células fueron transfectadas y tratadas como se indicó en la Figura 29. El análisis visual de las células transfectadas se llevó a cabo mediante un microscopio de fluorescencia tal y como se indica en el apartado 2.13 de Materiales y métodos. La distribución de la fluorescencia verde en las células se clasificó en H: homogénea, N: predominantemente nuclear, C: predominantemente citoplásmica o PN: predominantemente perinuclear. Se muestran los valores medios \pm SD en porcentaje de células con la distribución indicada de la fluorescencia. Nº Células corresponde al número total de células analizadas en un mínimo de tres transfecciones independientes realizadas por duplicado. A) Células transfectadas y tratadas para microscopía de fluorescencia. B) Las células fueron tratadas con leptomicina B 40 nM durante 6 horas. C) Las células fueron cotransfectadas con 1,5 μ g del plásmido pCMV-HA-CRM1 y tratadas para la detección de HA-CRM1 mediante inmunotinción con TexasRed. Solo se tuvieron en cuenta las células en las que se detectaba fluorescencia verde y roja. (*) Se consideraron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos frente a las células que expresaban la proteína ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP valores de $p < 0,05$ mediante el test *T de Student*.

A

Células sin tratar			
Distribución (% de células)	GFP	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ mt3
H	34,1 ± 5,5*	74,2 ± 6,5	21,6 ± 4,6*
N	65,4 ± 5,7*	22,1 ± 6,0	78,3 ± 4,8*
C	0,5 ± 0,6	3,3 ± 1,3	0,2 ± 0,4*
PN	0 ± 0	0,6 ± 1,1	0 ± 0
Nº Células	946	1972	1756

B

+ leptomicina B			
Distribución (% de células)	GFP	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ mt3
H	32,7 ± 5,9	29,1 ± 6,7	20,9 ± 6,1
N	66,6 ± 6,1	69,8 ± 6,6	78,8 ± 6,0
C	0,7 ± 0,7	0,7 ± 0,6	0,3 ± 0,5
PN	0 ± 0	0,3 ± 1,0	0 ± 0
Nº Células	791	1192	982

C

+ HA-CRM1			
Distribución (% de células)	GFP	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾	ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ mt3
H	16,9 ± 1,9	18,9 ± 2,8	42,4 ± 4,1*
N	81,1 ± 0,9*	0 ± 0	29,4 ± 2,9*
C	2,0 ± 1,0*	76,0 ± 1,5	28,2 ± 5,6*
PN	0 ± 0*	5,1 ± 1,9	0 ± 0
Nº Células	313	301	332

Figura 30 (Página siguiente). Localización subcelular de las proteínas de fusión ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP mutantes en células HEK293T. Las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio fueron transfectadas transitoriamente con 0,5 µg de los plásmidos pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ correspondientes. Transcurridas 42 horas, las muestras se prepararon para su análisis por microscopía de fluorescencia como se indica en el apartado 2.11 de Materiales y Métodos. Los núcleos celulares se tiñeron de azul con DAPI. El análisis de la distribución de la fluorescencia se realizó con un microscopio de fluorescencia y la adquisición de imágenes con un microscopio con sistema confocal, como se indica en el apartado 2.13 de Materiales y Métodos. A) Imágenes representativas de cada grupo de células adquiridas con un microscopio confocal LEICA DMIRE2. En las imágenes de la tinción con DAPI las barras de escala corresponden a 10 µm. B) Los datos representados se han extraído de la Tabla 12 y se expresan como valores medios ± SD en porcentaje de células que presentaban acumulación de fluorescencia mayoritariamente en el núcleo. C) Representación gráfica de los valores medios ± SD de las relaciones de intensidad N/C calculadas a partir de al menos 10 células de cada preparación. Para facilitar la comparación en B y C se han incluido los datos correspondientes a los controles: GFP, ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(mt3)-GFP (barras negras) extraídos de la Figura 29. Para el mutante ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(L306R)-GFP se han representado los datos correspondientes al 35% de las células en las que no detectamos agregados de fluorescencia. (*) Se consideraron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos frente a las células que expresaban la proteína ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP valores de $p < 0,05$ mediante el test *T de Student*.

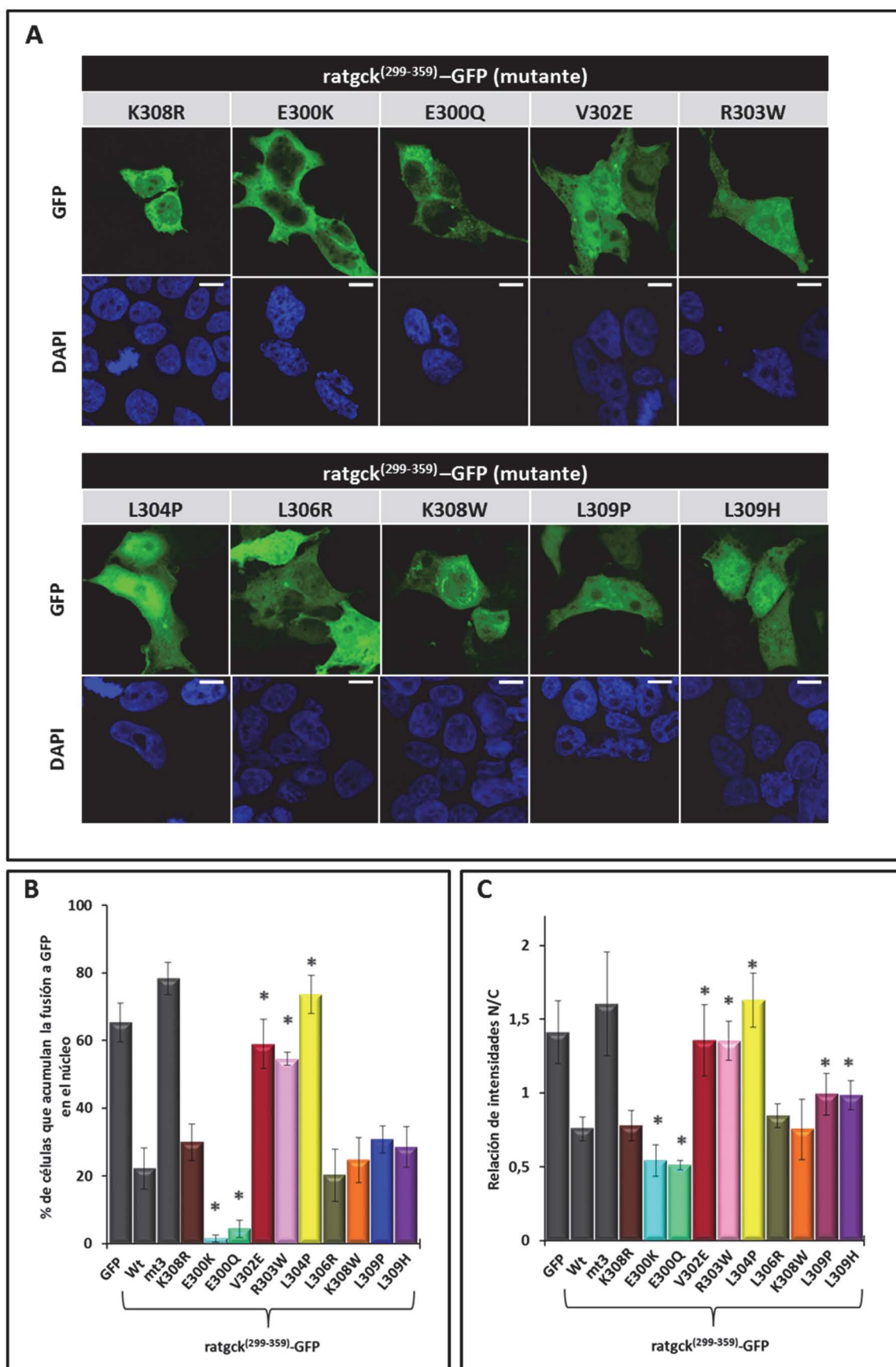


Figura 31 (Página siguiente). Localización subcelular de las proteínas de fusión ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP mutantes en células HEK293T tratadas con Leptomicina B 40 nM.

Las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio fueron transfectadas transitoriamente con 0,5 µg de los plásmidos pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ correspondientes. 42 horas tras la transfección, las células fueron incubadas en presencia de leptomicina B (LMB) 40 nM durante 6 horas y se prepararon para su análisis por microscopía de fluorescencia como se indica en el apartado 2.11 de Materiales y Métodos. Los núcleos celulares se tiñeron de azul con DAPI. El análisis de distribución de la fluorescencia se realizó con un microscopio de fluorescencia y la adquisición de imágenes con un microscopio con sistema confocal, como se indica en el apartado 2.13 de Materiales y Métodos. A) Imágenes representativas de cada grupo de células adquiridas con un microscopio confocal LEICA DMIRE2. En las imágenes de la tinción con DAPI las barras de escala corresponden a 10 µm. B) Los datos representados se han extraído de la Tabla 12 y se expresan como valores medios ± SD en porcentaje de células que presentaban acumulación de fluorescencia mayoritariamente en el núcleo. C) Representación gráfica de los valores medios ± SD de las relaciones de intensidad N/C calculadas a partir de al menos 10 células de cada preparación. Para facilitar la comparación en B y C se han incluido los datos correspondientes a los controles: GFP, ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(mt3)-GFP, extraídos de la Figura 29 (barras negras). Para el mutante ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(L306R)-GFP se han representado los datos correspondientes al 35% de las células en las que no detectamos agregados de fluorescencia. Para ninguno de los mutantes se observaron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos frente a las células que expresaban la proteína ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP, para valores de $p < 0,05$ utilizando el test *T de Student*.

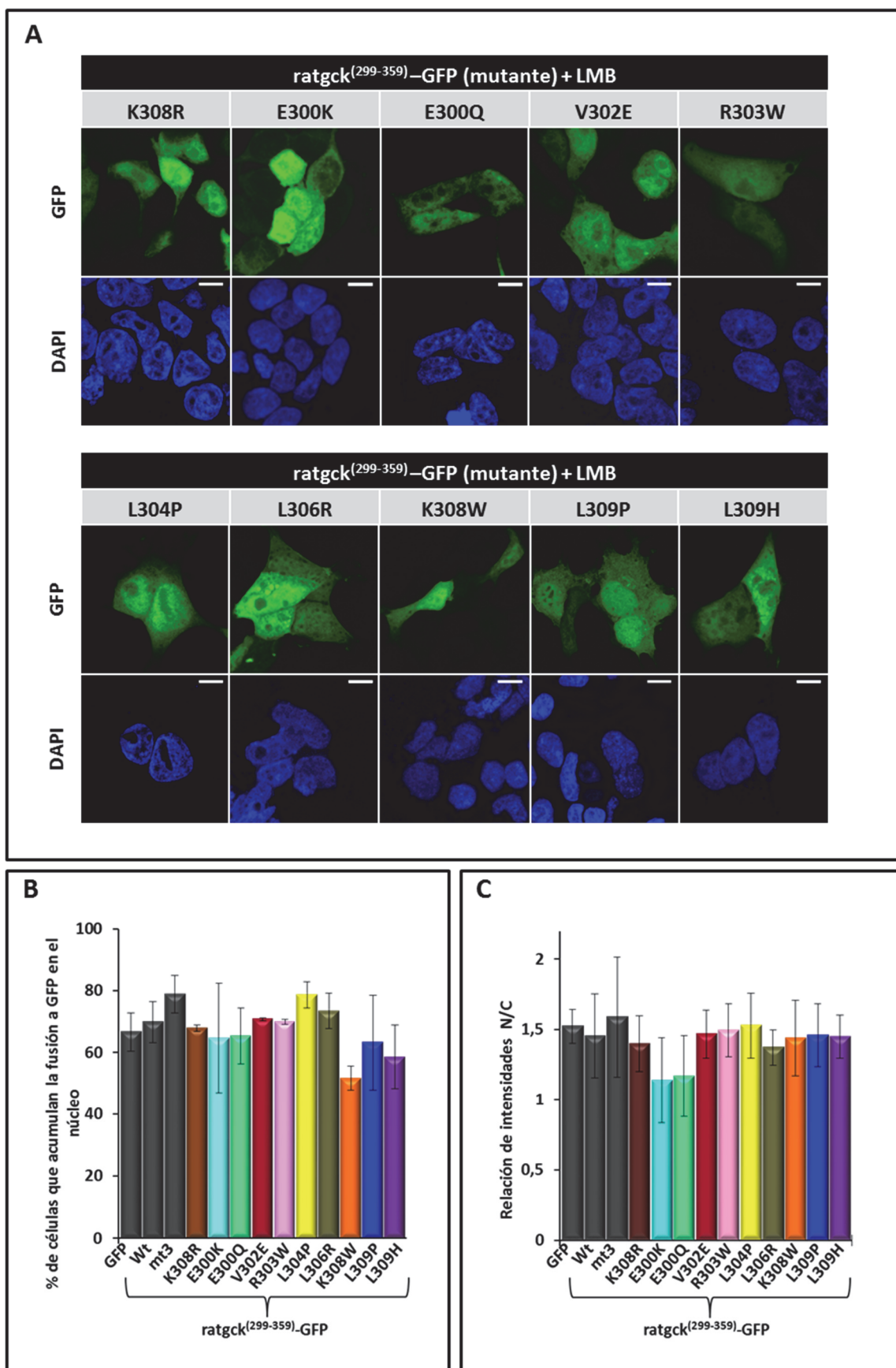


Figura 32 (Página siguiente). Localización subcelular de las proteínas de fusión ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP mutantes en células HEK293T que coexpresan HA-CRM1. Las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio fueron transfectadas transitoriamente con 0,5 µg de los plásmidos pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ correspondientes y 1,5 µg del plásmido pCMV-HA-CRM1. 42 horas tras la transfección, las células fueron tratadas para la detección de HA-CRM1 mediante inmunotinción con TexasRed, y se prepararon para su análisis por microscopía de fluorescencia como se indica en el apartado 2.11 de Materiales y Métodos. Los núcleos celulares se tiñeron de azul con DAPI. Para el análisis de la distribución de la fluorescencia solo se tuvieron en cuenta las células en las que se detectaba fluorescencia verde y roja, utilizando un microscopio de fluorescencia, y la adquisición de imágenes con un microscopio con sistema confocal, como se indica en el apartado 2.13 de Materiales y Métodos. A) Imágenes representativas de cada grupo de células adquiridas con un microscopio confocal LEICA DMIRE2. En las imágenes de la tinción con DAPI las barras de escala corresponden a 10 µm. B) Los datos representados se han extraído de la Tabla 12 y se expresan como valores medios ± SD en porcentaje de células que presentaban acumulación de fluorescencia mayoritariamente en el núcleo. C) Representación gráfica de los valores medios ± SD de las relaciones de intensidad N/C calculadas a partir de al menos 10 células de cada preparación. Para facilitar la comparación en B y C se han incluido los datos correspondientes a los controles: GFP, ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP y ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(mt3)-GFP extraídos de la Figura 29 (barras negras). Para el mutante ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(L306R)-GFP se han representado los datos correspondientes al 35% de las células en las que no detectamos agregados de fluorescencia. (*) Se consideraron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos frente a las células que expresaban la proteína ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP valores de $p < 0,05$ mediante el test *T de Student*.

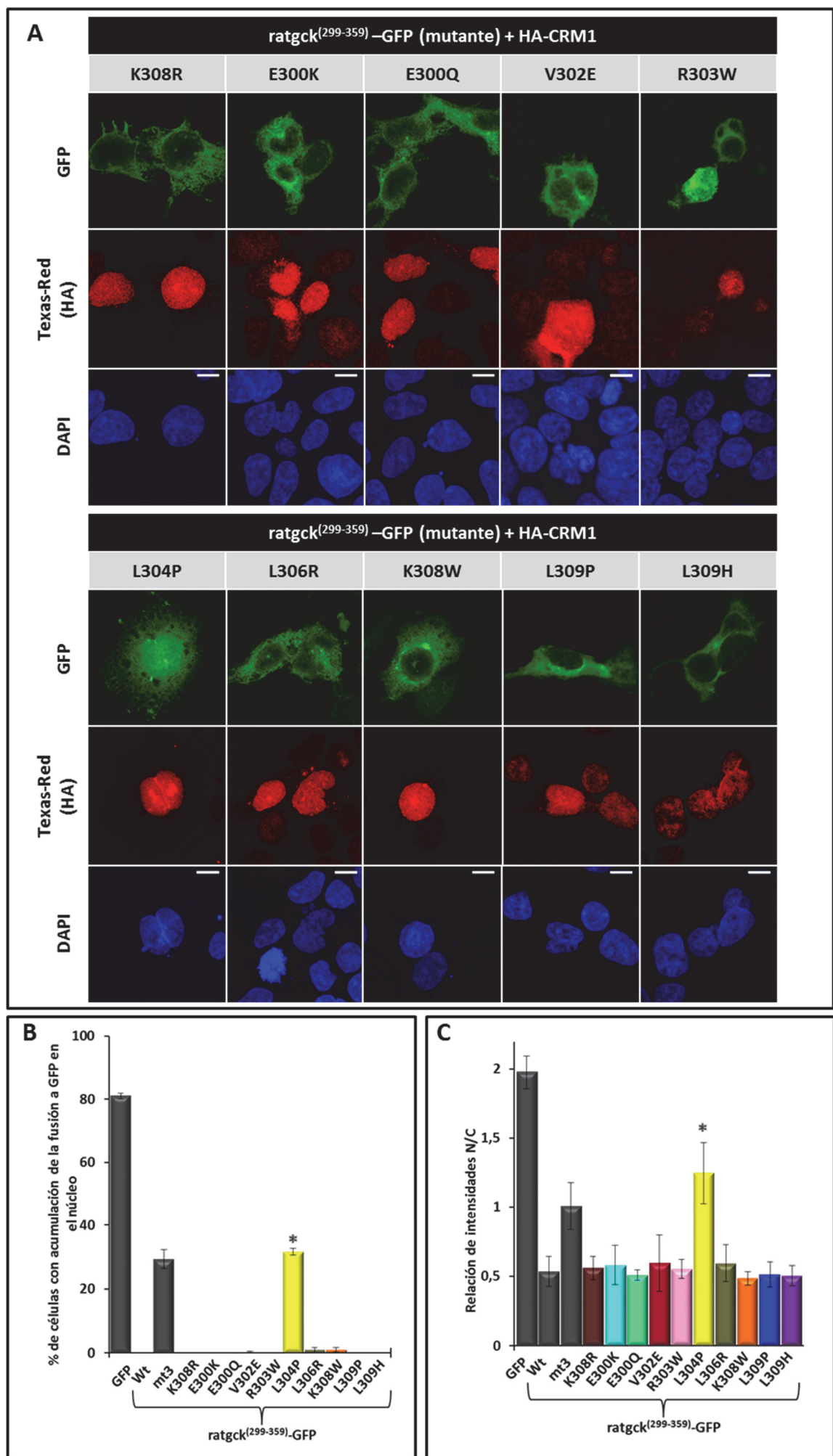


Figura 33. Localización subcelular de la proteína de fusión ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(E300K/L304P)-GFP en células HEK293T. Las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio fueron transfectadas transitoriamente con 0,5 µg del plásmido pEGFPN2-ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(E300K/L304P) y en los casos indicados con 1,5 µg del plásmido pCMV-HA-CRM1. 42 horas tras la transfección, las células fueron incubadas durante 6 horas con leptomicina B (LMB) 40 nM o tratadas para la detección de HA-CRM1 mediante inmunotinción con TexasRed, y se prepararon para su análisis por microscopía de fluorescencia como se indica en el apartado 2.11 de Materiales y Métodos. Los núcleos celulares se tiñeron de azul con DAPI. El análisis de la distribución de la fluorescencia se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia, y la adquisición de imágenes con un microscopio con sistema confocal, como se indica en el apartado 2.13 de Materiales y Métodos. En el caso de la cotransfección con pCMV-HA-CRM1 solo se tuvieron en cuenta las células en las que se detectaba fluorescencia verde y roja. A) Imágenes representativas de cada grupo de células adquiridas con un microscopio confocal LEICA DMIRE2. En las imágenes de la tinción con DAPI las barras de escala corresponden a 10 µm. B) Los datos representados se han extraído de la Tabla 12 y se expresan como valores medios ± SD en porcentaje de células que presentaban acumulación de fluorescencia mayoritariamente en el núcleo. C) Representación gráfica de los valores medios ± SD de las relaciones de intensidad N/C calculadas a partir de al menos 10 células de cada preparación. Para facilitar la comparación en B y C se han incluido los datos correspondientes a los controles: GFP, ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP, ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(mt3)-GFP, ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(E300K)-GFP y ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(L304P)-GFP extraídos de las Figuras 29 a 32 (barras negras). (*) Se consideraron diferencias significativas, al comparar los valores obtenidos frente a las células que expresaban la proteína ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP, valores de $p < 0,05$ mediante el test *T de Student*.

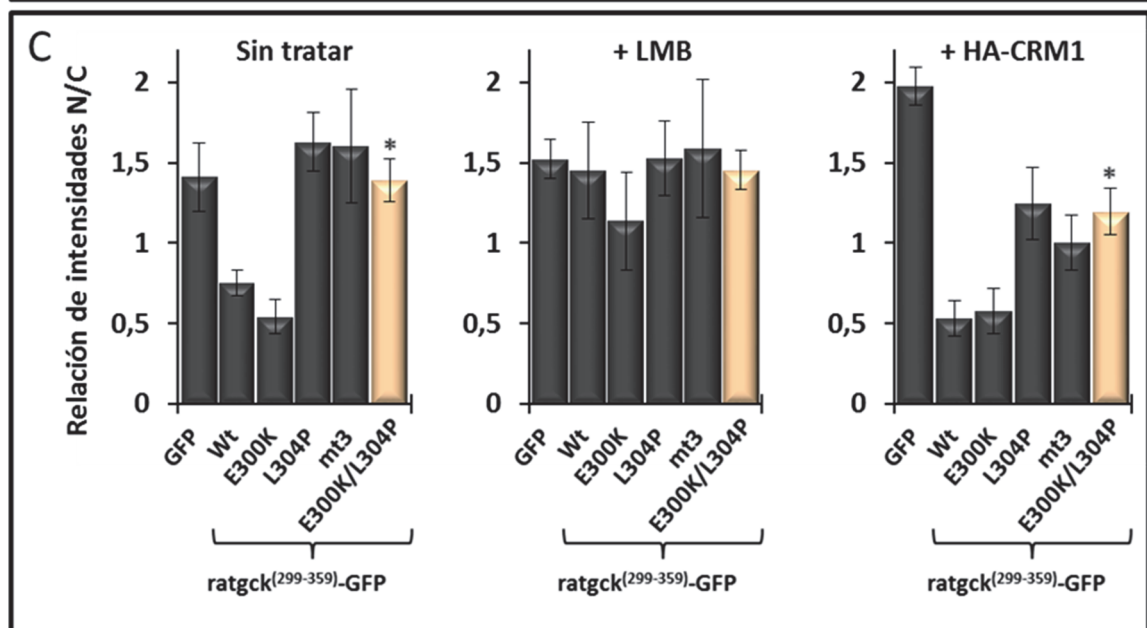
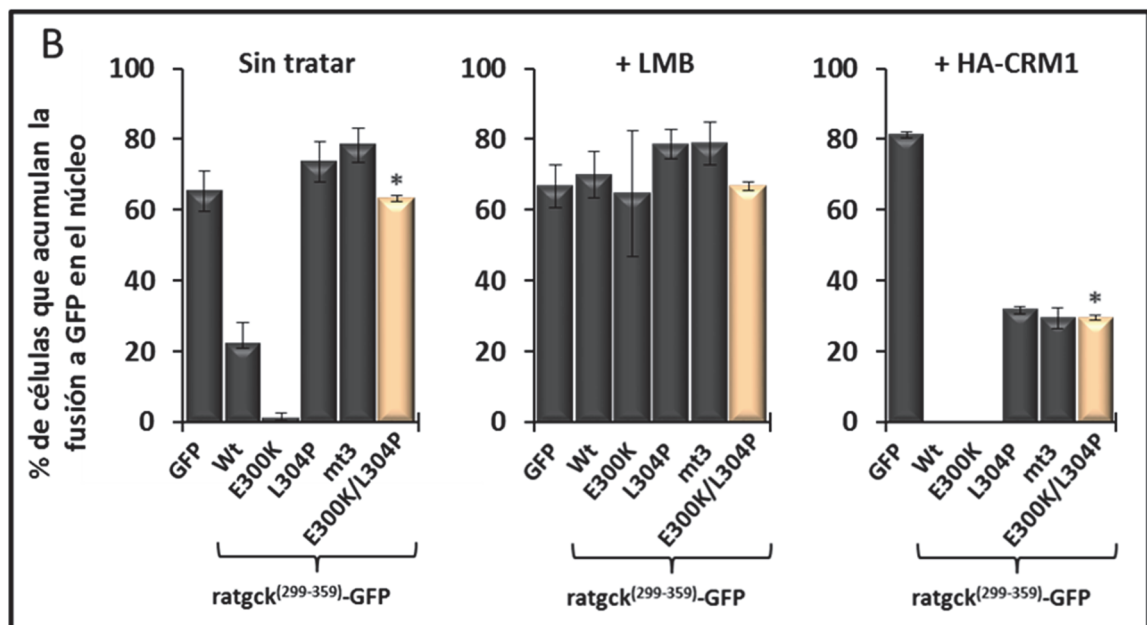
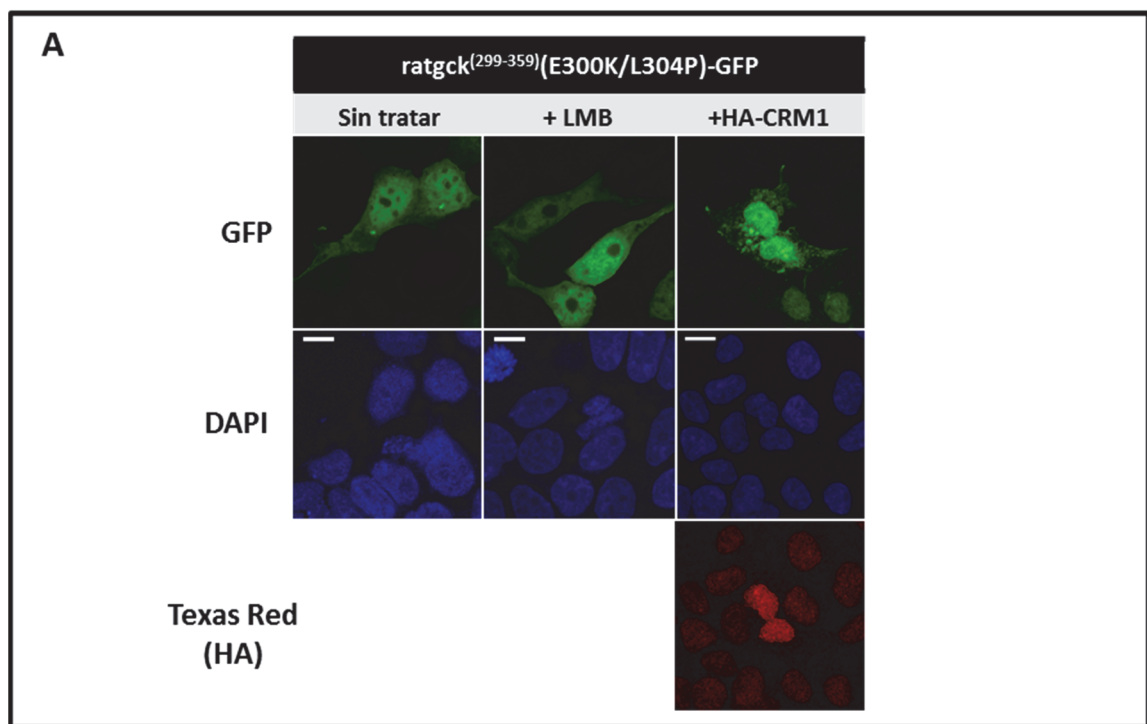


Tabla 12 (Página siguiente). Distribución subcelular de las proteínas, ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP mutantes en células HEK293T. Las células fueron transfectadas y tratadas como se indicó en las Figuras 30 a 33. El análisis visual de las células transfectadas se llevó a cabo mediante un microscopio de fluorescencia tal y como se indica en el apartado 2.13 de Materiales y métodos. La distribución de la fluorescencia verde en las células se clasificó en H: homogénea, N: predominantemente nuclear, C: predominantemente citoplásmica o PN: predominantemente perinuclear. Se muestran los valores medios \pm SD en porcentaje de células con la distribución indicada de la fluorescencia. Para el mutante ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(L306R)-GFP se han representado los datos correspondientes al 35% de las células en las que no detectamos agregados de fluorescencia. N^o células corresponde al número total de células analizadas en un mínimo de tres transfecciones independientes realizadas por duplicado. A) Células transfectadas y tratadas para microscopía de fluorescencia. B) Las células fueron tratadas con leptomicina B 40 nM durante 6h. C) Las células fueron cotransfectadas con 1,5 μ g del plásmido pCMV-HA-CRM1 y tratadas para la detección de HA-CRM1 mediante inmunotinción con TexasRed, solo se tuvieron en cuenta las células en las que se detectaba fluorescencia verde y roja. (*) Se consideraron diferencias significativas, al comparar los valores obtenidos frente a las células que expresaban la proteína ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP (Tabla 11), valores de $p < 0,05$ mediante el test *T de Student*.

A

ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (Mutantes)-GFP											
Distribución % de células	K308R	E300Q	E300K	V302E	R303W	L304P	L306R	K308W	L309P	L309H	E300K/L304P
H	63,5 ± 5,4	30,4 ± 3,2*	28,3 ± 2,8*	33,0 ± 4,3*	41,7 ± 4,4*	25,0 ± 4,4*	72,3 ± 14,3	16,0 ± 3,9*	67,2 ± 4,8	69,7 ± 6,6	33,3 ± 0,7*
N	27,0 ± 4,7	1,6 ± 1,1*	4,5 ± 2,6*	59,0 ± 7,2*	54,5 ± 1,9*	73,6 ± 5,6*	20,2 ± 7,6	24,7 ± 2,9	30,7 ± 4,1	28,6 ± 6,0	63,2 ± 1,0*
C	5,0 ± 2,9	67,8 ± 3,3*	65,9 ± 4,6*	2,0 ± 0,5*	1,6 ± 0,5*	0,2 ± 0,4*	1,6 ± 0,5*	5,9 ± 3,1	1,6 ± 0,7*	1,3 ± 0,6*	1,1 ± 0,4*
PN	4,5 ± 1,8	0,3 ± 0,5	0,8 ± 1,4	0 ± 0	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,7	0,5 ± 0,9	53,4 ± 2,1*	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,8	2,4 ± 1,4
Nº células	816	896	1250	369	310	958	612	380	706	568	462

B

ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (Mutantes)-GFP + leptomicina B											
Distribución % de células	K308R	E300Q	E300K	V302E	R303W	L304P	L306R	K308W	L309P	L309H	E300K/L304P
H	30,4 ± 1,3	8,1 ± 6,0*	8,9 ± 3,5*	29,0 ± 0,0	29,2 ± 1,5	21,0 ± 4,2	25,9 ± 5,9	16,5 ± 3,7*	36,8 ± 15	41,4 ± 20,4	31,2 ± 0,6
N	67,9 ± 1,0	64,7 ± 19,7	65,4 ± 9,0	70,8 ± 0,4	69,9 ± 0,8	78,6 ± 4,2	73,4 ± 5,8	51,7 ± 0,7*	63,2 ± 15,2	58,6 ± 10,4	66,7 ± 1,2
C	0 ± 0	27,2 ± 14,6*	25,6 ± 6,8*	0 ± 0	0,6 ± 1,1	0,1 ± 0,3	0,4 ± 0,5	1,1 ± 0,3	0 ± 0	1,4 ± 0,7	0,6 ± 0,5
PN	2,3 ± 1,6	0 ± 0	0,2 ± 0,6	0,2 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,1 ± 0,4	0,3 ± 0,8	30,5 ± 3,9*	0 ± 0	0,4 ± 0,8	1,5 ± 1,0
Nº células	525	674	830	570	334	779	581	647	447	469	324

C

ratgck ⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾ (Mutantes)-GFP + CRM 1-HA											
Distribución % de células	K308R	E300Q	E300K	V302E	R303W	L304P	L306R	K308W	L309P	L309H	E300K/L304P
H	23,2 ± 1,1	20,0 ± 1,0	22,1 ± 0,2	24,9 ± 1,0	27,6 ± 1,8	38,7 ± 3,9*	18,0 ± 7,9	6,1 ± 3,5*	22,9 ± 11,0	20,0 ± 9,1	42,3 ± 1,1*
N	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,3 ± 0,6	0 ± 0	31,7 ± 1,1*	1,0 ± 1,7	1,1 ± 1,1	0,4 ± 0,6	0 ± 0	29,5 ± 0,8*
C	71,9 ± 1,0	76,2 ± 3,0	75,8 ± 2,6	73,1 ± 3,6	69,4 ± 3,2	29,2 ± 3,4*	74,2 ± 4,8	50,4 ± 2,7*	73,7 ± 13,1	75,4 ± 14,2	26,9 ± 0,4*
PN	5,0 ± 0,1	3,8 ± 4,0	2,1 ± 2,6	1,7 ± 2,1	3,0 ± 1,7	0,4 ± 0,6	6,8 ± 4,0	42,4 ± 3,2*	2,7 ± 2,1	3,3 ± 4,2	1,3 ± 0,5
Nº células	306	296	303	312	308	310	301	298	293	302	376

2.3 Análisis cinético y de estabilidad proteica de proteínas GST-GCK portadoras de mutaciones en la secuencia NES de la glucokinasa.

Con el objetivo de profundizar en el análisis de las mutaciones localizadas en la secuencia NES de la glucokinasa, se procedió a llevar a cabo una caracterización funcional más amplia para comprobar si se detectan defectos en la actividad enzimática, la estabilidad proteica y la unión a su proteína reguladora GGRP.

El efecto de algunas de estas mutaciones sobre la cinética enzimática había sido analizado previamente. Las mutaciones V302E, R303W y R308W habían sido estudiadas en nuestro laboratorio ((193), García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168), (194)). Las mutaciones en el residuo Glu300 y la mutación L309P, habían sido analizadas por otros (204, 206, 212, 213).

Para determinar el efecto de las mutaciones L304P, L306R y L309H se llevaron a cabo las correspondientes mutagénesis sobre el plásmido pGEX-5X-2-GCK. Las proteínas de fusión GST-GCK mutantes se purificaron desde *E. coli* obteniéndose los rendimientos de purificación mostrados en la Tabla 13. El rendimiento para los mutantes GST-GCK(L304P) y GST-GCK(L306R) fue significativamente menor que para la proteína de referencia GST-GCK. La integridad de las preparaciones se comprobó mediante SDS-PAGE (Figura 34).

Las mutaciones en la NES aquí analizadas provocan una fuerte inactivación de la enzima (Tabla 14). Los mutantes GST-GCK(L304P) y GST-GCK(L309H) poseen índices de actividad global de alrededor del 10% del valor de la referencia y el mutante GST-GCK(L306R) menor del 4%. Los bajos índices de actividad se deben principalmente a una fuerte disminución de la constante catalítica (K_{cat}), que en el caso del mutante GST-

GCK(L306R) es reducida en más del 99% del valor de la referencia GST-GCK. La cooperatividad por glucosa se ha perdido en este mutante y ha disminuido significativamente en el mutante GST-GCK(L304P), como muestran sus valores de índice de Hill próximos a 1. Las afinidades por los sustratos también están alteradas en los tres mutantes. El aumento, pequeño pero significativo, de los valores de $S_{0.5}$ indica una disminución en la afinidad por la glucosa. Además los valores de K_m para el ATP también muestran variaciones significativas frente a la referencia GST-GCK.

Por otra parte, ensayos de estabilidad en función de la temperatura, mostraron que los mutantes GST-GCK(L304P) y GST-GCK(L309H) son más sensibles a la inactivación por aumento de temperatura que la referencia GST-GCK (Figura 35A). En especial el mutante GST-GCK(L304P), que perdió un 30% de actividad al ser incubado durante media hora a 37°C y más del 50% tras 5 minutos a 50°C (Figura 35B). El mutante GST-GCK(L306R) fue excluido de estos ensayos debido a que poseía una actividad catalítica demasiado baja.

2.4 Efecto de las mutaciones de la secuencia NES sobre la interacción de la glucokinasa con su proteína reguladora GGRP.

Para analizar si la presencia de mutaciones en la secuencia NES de la glucokinasa afectaba a la sensibilidad de esta a ser inhibida por la GGRP, se valoró la actividad enzimática de las proteínas mutantes GST-GCK(L304P) y GST-GCK(L309H) a distintas concentraciones de GGRP-Flag, en presencia de S6P 10 μ M o de F1P 0,2 mM. Se excluyó de estos ensayos la mutación L306R por presentar una actividad catalítica demasiado baja y se incluyeron los mutantes GST-GCK(R303W) y GST-GCK(R308W) estudiados previamente en nuestro laboratorio (García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168)) y la

proteína GST-GCK(A456V) como control negativo. Como se muestra en la Figura 36, las mutaciones analizadas, que se localizan en la secuencia NES de la glucokinasa, no tienen efecto sobre la sensibilidad de la enzima a la inhibición por la proteína reguladora GKR. P.

2.4.1 Efecto de las mutaciones de la NES sobre la localización subcelular de la glucokinasa en células que coexpresan GKR.

Para evaluar si las mutaciones situadas en la NES de la glucokinasa pudieran interferir en el mecanismo de entrada de la enzima al núcleo se generaron los correspondientes plásmidos pEGFPC3-GCK mutantes, según se describe en el apartado 1.2 de Materiales y Métodos y con ellos se transfectó la línea celular HepG2. Debido a que, como se ha descrito anteriormente, la entrada al núcleo de la GCK es dependiente de la GKR, las células se cotransfectaron junto con al el plásmido pmCherry-GKR o, como control, el plásmido pmCherry. La expresión de las proteínas de fusión GFP-GCK se confirmó mediante *western blot* (Figura 37).

Proteína	Rendimiento proteico (mg /L)
GST-GCK	4,6 ± 1,6
GST-GCK(R303W)	3,2/2,4
GST-GCK(L304P)	1,6 ± 0,5*
GST-GCK(L306R)	1,1 ± 0,1*
GST-GCK(R308W)	3,2/2,4
GST-GCK(L309H)	4,8/3,6

Tabla 13. Rendimiento de purificación de las proteínas GST-GCK silvestre y mutadas en la NES de la glucokinasa. Los resultados se muestran como media ± SD de los valores obtenidos en al menos dos purificaciones independientes. Los datos se expresan en miligramos de proteína obtenida por litro de cultivo de partida. La concentración de proteína se determinó mediante el *kit Bio-Rad Protein Assay*. (*) Se consideraron diferencias significativas respecto a la proteína GST-GCK, valores de $p < 0,05$ mediante el test *T de Student*.

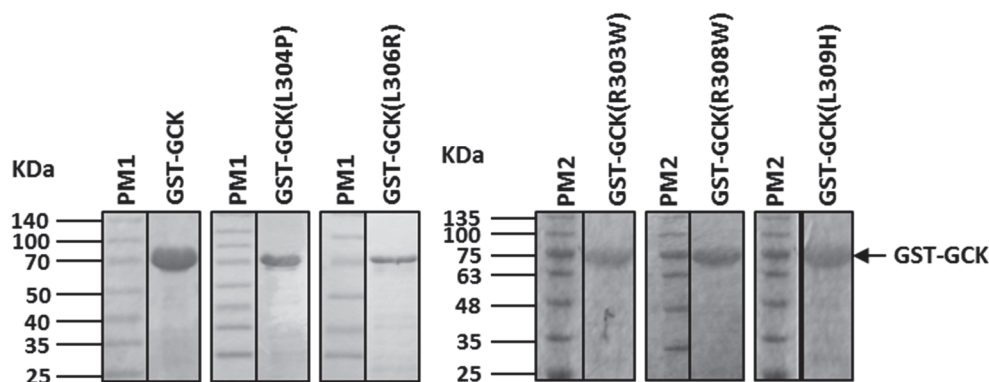
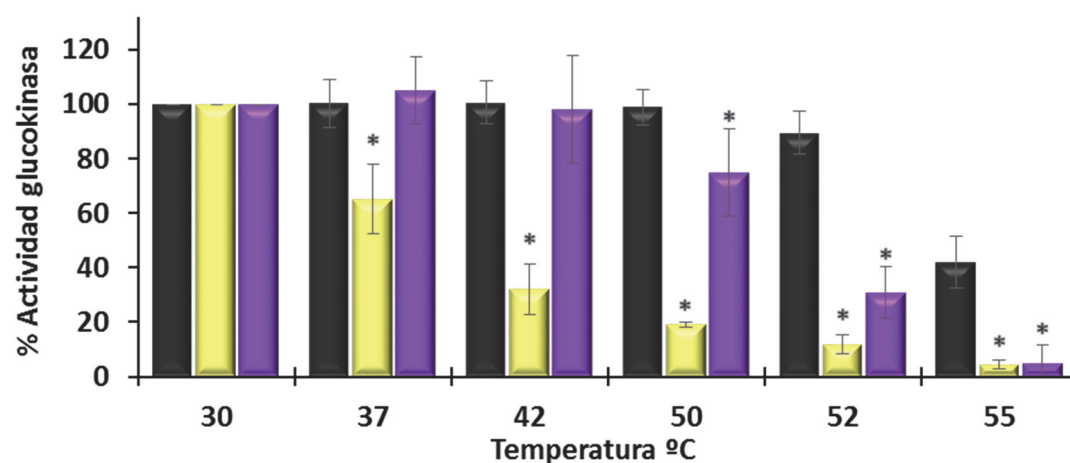


Figura 34. Proteínas GST-GCK portadoras de mutaciones en la NES. Se muestra una figura representativa de cada una de las proteínas purificadas tras ser sometidas a SDS-PAGE al 10% y tinción con *Bluesafe*, salvo en el caso de los mutantes GST-GCK(L304P) y GST-GCK(L306R) cuya tinción se realizó con coomasie, como se describe en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos. Se observó una única banda para cada purificación de aproximadamente 75 KDa señalada con una flecha PM1: marcador de peso molecular *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas). PM2: *NZYS Colour Protein Marker II* (NZYTech). A modo ilustrativo se señalan los pesos moleculares de ambos patrones en un caso para cada tipo.

	Kcat (s-1)	h	S _{0,5} para glucosa (mM)	Km para ATP (mM)	Iar
GST-GCK (n=11)	58,3 ± 14,7	1,45 ± 0,07	7,7 ± 0,56	0,51 ± 0,06	1
GST-GCK(L304P) (n=7)	7,4 ± 2,2*	1,05 ± 0,18*	11,3 ± 1,03*	0,59 ± 0,06*	0,11 ± 0,06*
GST-GCK(L306R) (n=7)	0,7 ± 0,3*	0,99 ± 0,05*	11,4 ± 1,9*	0,40 ± 0,01*	0,02 ± 0,01*
GST-GCK(L309H) (n=6)	9,6 ± 3,0*	1,37 ± 0,15	10 ± 0,97*	0,45 ± 0,07*	0,10 ± 0,011*

Tabla 14. Parámetros cinéticos de las proteínas GST-GCK mutadas en la NES de la glucokinasa. Los ensayos fueron llevados a cabo en un espectrofotómetro UVIKONxl (Secomam) y los parámetros cinéticos calculados como se describe en el apartado 2.7.1 de Materiales y Métodos. El índice de actividad de cada mutante fue referido al de la proteína de referencia GST-GCK para obtener los valores de Índice de actividad relativo (Iar). Los datos se expresan como media ± SD de 6 valoraciones realizadas en proteínas procedentes de al menos dos purificaciones independientes. El coeficiente de Hill (h) y el Iar carecen de unidades. (*) Se consideraron diferencias significativas valores de $p < 0,05$ al comparar los valores obtenidos con la proteína de referencia GST-GCK. Se utilizó el test *U* de *Mann–Whitney* en el caso de Iar y el test *T* de *Student* para el resto de los parámetros.

A



B

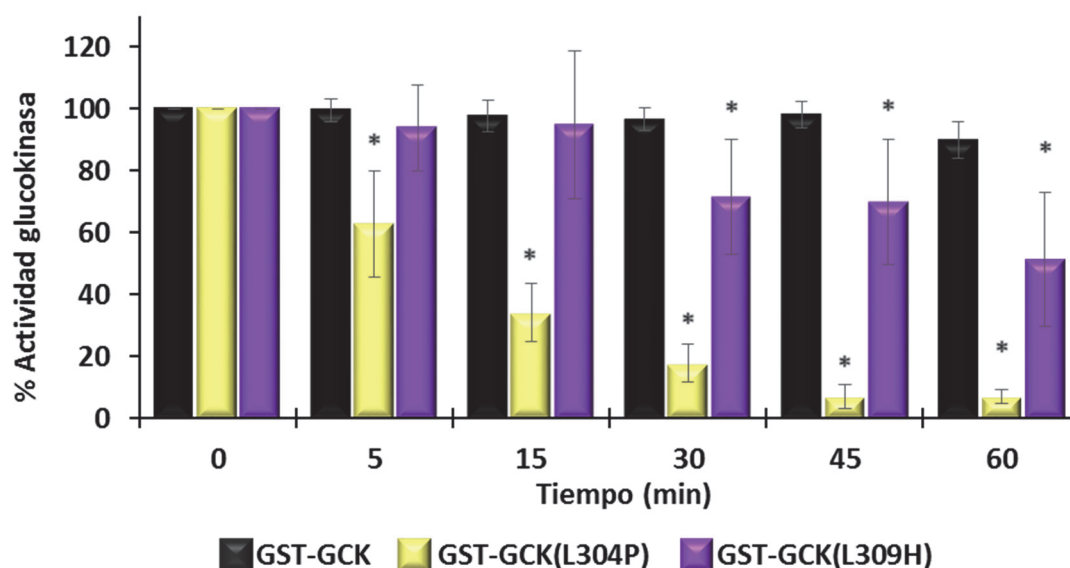


Figura 35. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las proteínas GST-GCK silvestre y mutantes de la NES. Diluciones de proteína a 0,25 mg/ml en tampón de congelación (glicerol al 30%, glucosa 50 mM, glutatión 10 mM, DTT 5 mM, KCl 200 mM y Tris/HCl 50 mM (pH 8)) fueron incubadas a diferentes temperaturas durante 30 min (A) ó a 50°C durante distintos tiempos (B). Posteriormente se realizaron, en ambos casos, ensayos de actividad enzimática a 30°C. Los datos representados corresponden a la media \pm SD de al menos 4 valoraciones independientes. (*) Se consideraron diferencias significativas respecto a la proteína de referencia GST-GCK valores de $p < 0,05$ mediante el test *U* de Mann–Whitney.

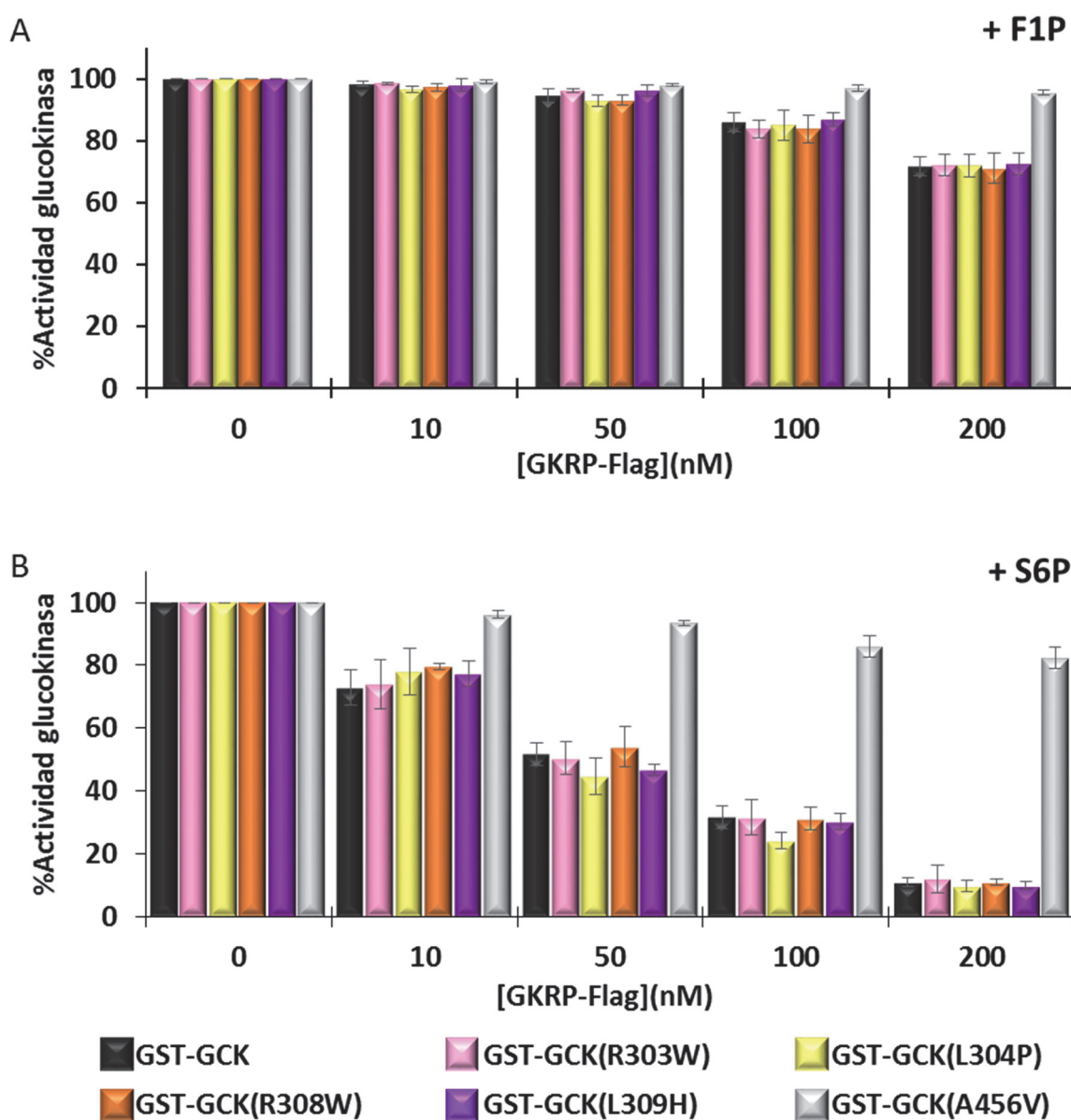


Figura 36. Efecto de la GKR-Flag sobre la actividad de las proteínas GST-GCK silvestre y mutantes de la NES. El ensayo se realizó en un volumen final de 50 μ l a 30°C en un espectrofotómetro UVIKONxl (*Secomam*), en presencia de S6P 10 μ M (A) o de F1P 0,2 mM (B), glucosa 5 mM y las concentraciones indicadas de GKR-Flag. Los valores representados corresponden a la media \pm SD de los valores obtenidos en al menos seis ensayos independientes para cada proteína. Solamente se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a la proteína de referencia GST-GCK en el caso del mutante control A456V, para concentraciones mayores de 100 y 10 nM de GKR-Flag en presencia de F1P y S6P respectivamente, utilizando el test *U* de *Mann-Whitney*.

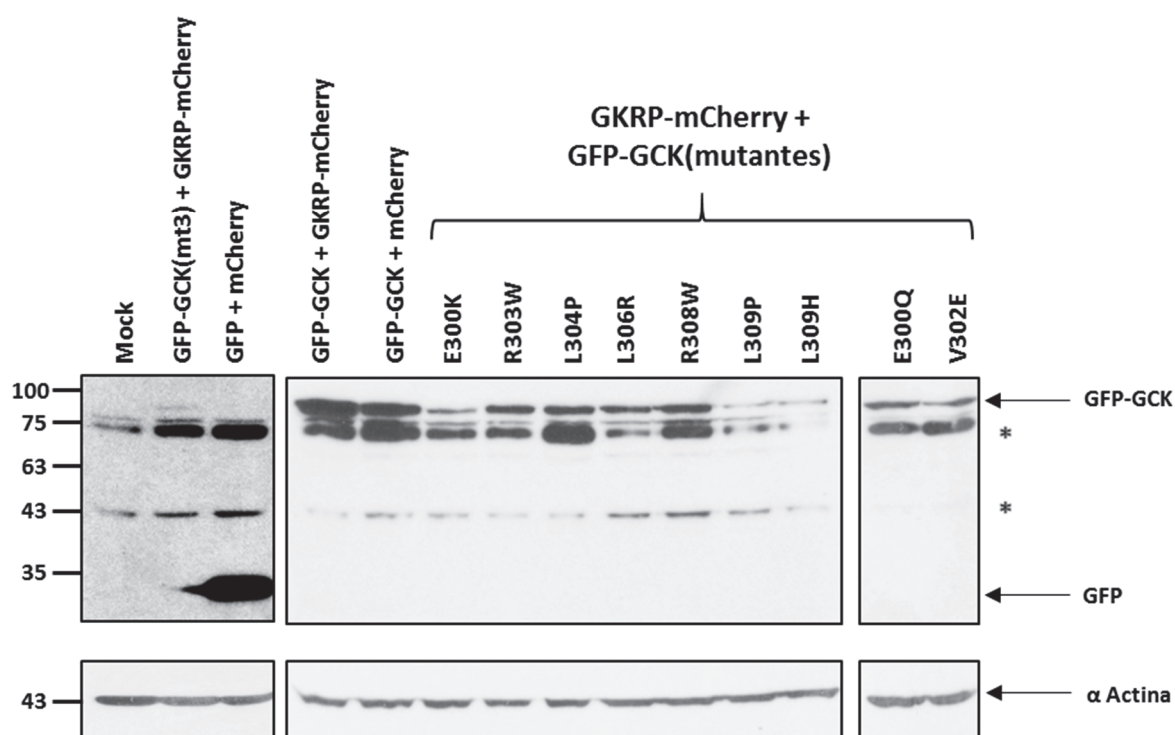


Figura 37 (Página siguiente). Inmunodetección mediante *western blot* de las proteínas GFP-GCK silvestre y mutantes de la NES. Células HepG2 fueron cotransfectadas con 2 µg de los plásmidos pEGFPC3 y pEGFPC3-GCK silvestre y mutantes y 6 µg de los plásmidos pmCherry o pmCherry-GGRP. Transcurridas 42 horas, se recogieron y lisaron como se indica en el apartado 2.10 de Materiales y Métodos. Las preparaciones se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios *rabbit anti GFP-Nter*; *Monoclonal Mouse Anti-Actin*, respectivamente. Se utilizaron los correspondientes anticuerpos secundarios *Goat anti rabbit-HRP*; *ECL anti Mouse IgG*, *HRP-linked*. En cada carril se indican las proteínas expresadas tras la transfección. Mock: Células no transfectadas. Las flechas señalan las bandas correspondientes a las proteínas indicadas. Los asteriscos señalan bandas inespecíficas.

La localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-GCK mutantes fue analizada mediante microscopía de fluorescencia (Figura 38 y Tabla 15). Todos los mutantes GFP-GCK se localizaban principalmente en el citoplasma de las células transfectadas que coexpresaban la proteína mCherry libre (resultados no mostrados). Sin embargo, en presencia de GKRP la mayoría de los mutantes se localizaban principalmente en el núcleo igual que la proteína de referencia GFP-GCK (compárense los datos mostrados en las Figuras 24A y 38 y en las Tablas 10 y 15). La excepción fueron los mutantes GFP-GCK(L306R) y GFP-GCK(L309P) que se mantenían en el citoplasma en más del 60% de las células analizadas, aunque estas coexpresaran GKRP-mCherry. Además, en un porcentaje significativo de células ($24,8 \pm 21,1$ $p = 0,045$) la fusión GKRP-mCherry colocalizaba en el citoplasma con el mutante GFP-GCK(L309P). La localización citoplásmica del mutante GFP-GCK(L309P) fue igualmente observada en células HEK293T tratadas con leptomicina B y en células COS-7 cotransfectadas con GKRP (resultados no mostrados).

2.4.2 Efecto de las mutaciones de la NES sobre la interacción de la glucokinasa con la GKRP en el sistema de doble híbrido en levadura.

Para investigar si el defecto de localización nuclear de las proteínas mutantes GFP-GCK(L306R) y GFP-GCK(L309P) era debido a un impedimento en la interacción proteína-proteína entre estos mutantes y la GKRP, se llevaron a cabo experimentos de doble híbrido en levadura tal y como se ha descrito en apartados anteriores.

Los resultados de la Figura 39 muestran que, en este sistema, las mutaciones L309P y L309H no afectaban a la unión de la GCK con la GKRP. Por el contrario, el mutante GCK(L306R) no interacciona con la proteína reguladora GKRP.

Figura 38 (Página siguiente). Análisis de localización subcelular de las proteínas GFP-GCK mutantes y GGRP-mCherry en células HepG2. Las células adheridas a cubreobjetos de vidrio fueron transfectadas transitoriamente, en placas multipocillos de 6 pocillos, con 1 µg de los plásmidos pEGFPC3 o pEGFPC3-GCK correspondientes y 3 µg de los plásmidos pmCherry o pmCherry-GGRP. Transcurridas 42 horas tras la transfección, las células fueron fijadas y los núcleos se tiñeron de azul con DAPI, como se describe en el apartado 2.11 de Materiales y Métodos. El análisis de la distribución de la fluorescencia se realizó con un microscopio de fluorescencia y solo se tuvieron en cuenta las células en las que se observaba fluorescencia verde y roja. La adquisición de imágenes se llevó a cabo con un microscopio con sistema confocal, como se indica en el apartado 2.13 de Materiales y Métodos. A) Se muestran imágenes representativas de células que coexpresan las proteínas GFP-GCK mutantes y GGRP-mCherry. Las barras de escala situadas en las imágenes con DAPI corresponden a 10 µm. Para facilitar la comparación se han incluido las imágenes de la Figura 24A correspondientes al control GFP-GCK que se ha nombrado como Wt. B) Porcentaje de células que acumulan las fusiones a GFP (fluorescencia verde) en el citoplasma. C) Porcentaje de células que acumulan las fusiones a mCherry (fluorescencia roja) en el citoplasma. Los datos representados se han extraído de la Tabla 15 y se expresan como valores medios ± SD. Para facilitar la comparación se han incluido los datos de la Tabla 10 correspondientes a los controles GFP y GFP-GCK (barras negras). (*) Se consideraron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos frente a las células que expresaban la proteína de referencia GFP-GCK, valores de $p < 0,05$ mediante el test *T de Student*.

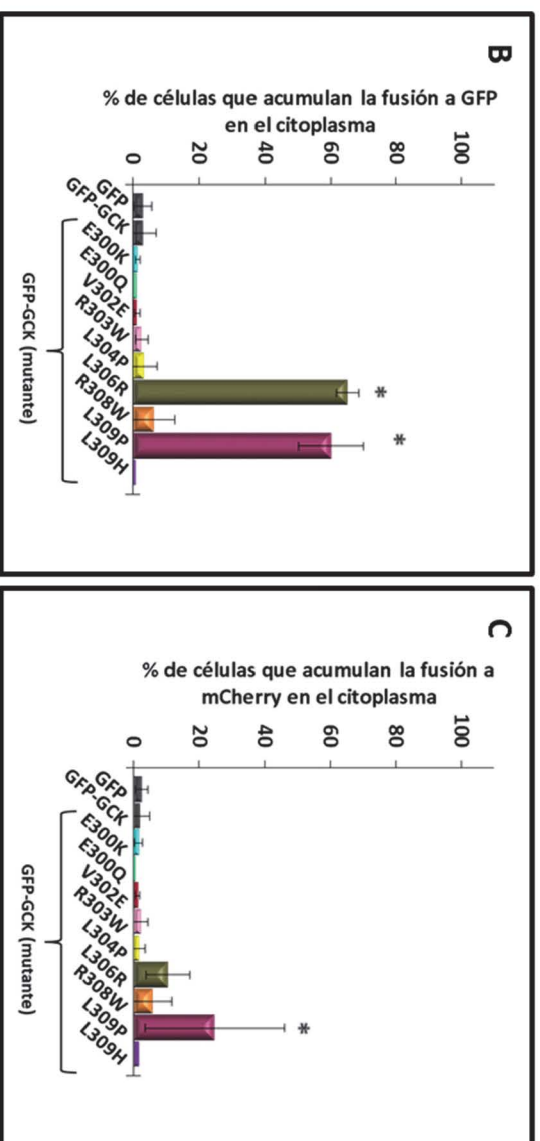
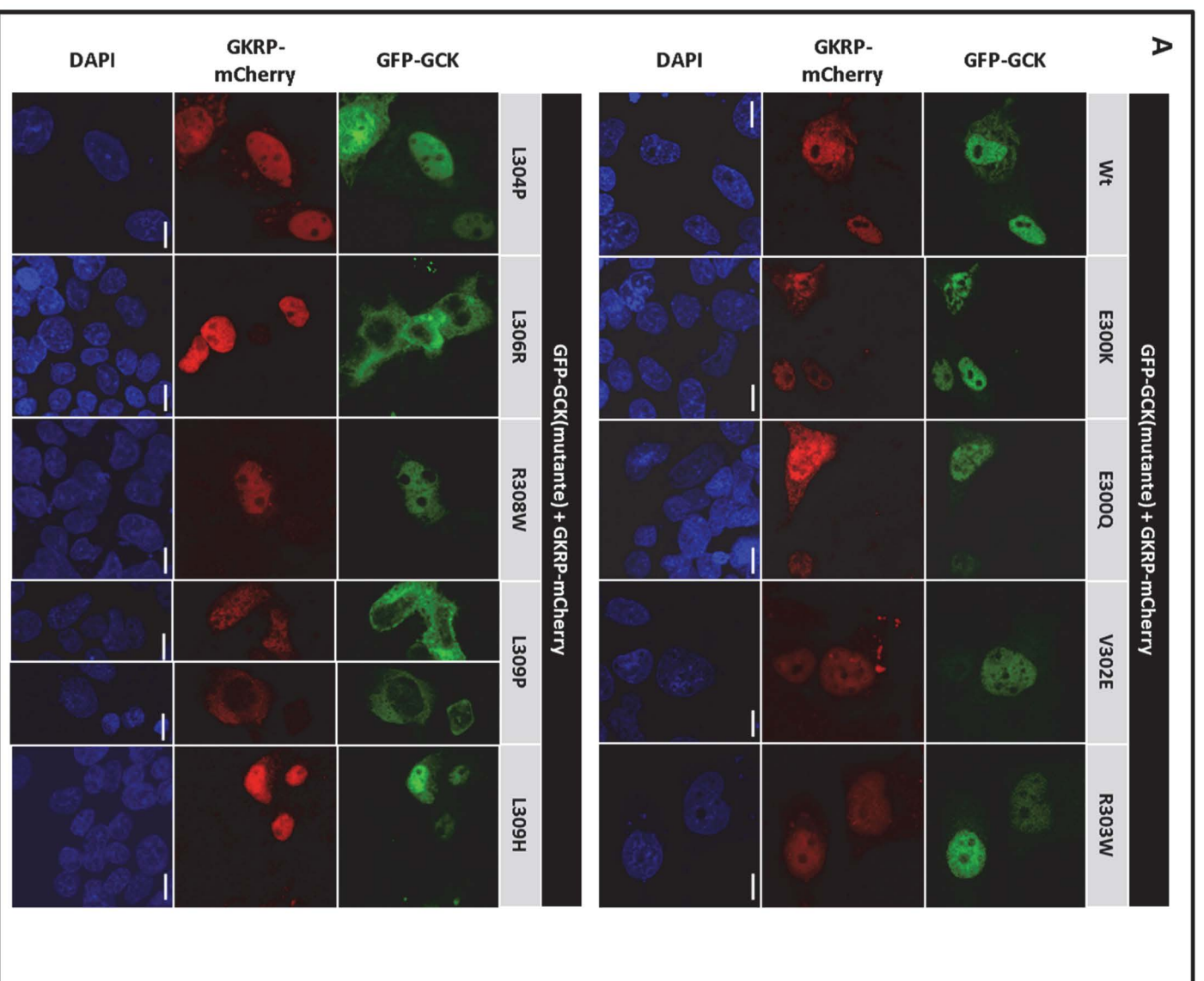


Tabla 15. Distribución subcelular de las proteínas de fusión GFP-GCK mutantes y GKRP-mCherry en células HepG2. Las células fueron transfectadas y tratadas como se indicó en la Figura 38. El análisis visual de las células transfectadas se llevó a cabo mediante un microscopio de fluorescencia tal y como se indica en el apartado 2.13 de Materiales y Métodos. La distribución de la fluorescencia en las células se clasificó en H: homogénea, N: predominantemente nuclear o C: predominantemente citoplásmica. Se muestran los valores medios \pm SD en porcentaje, de células con la distribución indicada de la fluorescencia. Nº Células corresponde al número total de células analizadas en un mínimo de tres cotransfecciones independientes realizadas por duplicado, salvo para GFP-GCK(E300Q) y GFP-GCK(L309H) para las que solo se llevó a cabo una transfección realizada por duplicado. Solo se tuvieron en cuenta las células en las que se detectaba fluorescencia verde y roja. Notese que los datos presentados en la columna control referido a GFP-GCK refleja la media obtenida de los experimentos mostrados en este apartado y los mostrados en el apartado 1.7 (Tabla 10). (*) Se consideraron diferencias significativas, al comparar los valores obtenidos frente a las células que expresaban la proteína GFP-GCK, valores de $p < 0,05$ mediante el test *T de Student*.

GFP-GCK(Mutante) + GKR-mCherry											
	Distribución (% de células)	Wt	E300Q	E300K	V302E	R303W	L304P	L306R	R308W	L309P	L309H
Fluorescencia Verde	H	31,1 ± 5,2	31,7	37,6 ± 3,4	28,0 ± 2,7	25,0 ± 5,4	31,9 ± 2,2	29,8 ± 5,8	26,3 ± 4,9	30,5 ± 5,3	33,9
	N	65,9 ± 3,6	67,1	60,9 ± 4,0	70,7 ± 2,4	72,3 ± 3,1	64,7 ± 3,9	5,1 ± 6,8*	67,4 ± 3,0	9,3 ± 7,7*	65,4
	C	3,1 ± 4,3	1,2	1,5 ± 0,7	1,3 ± 0,8	2,7 ± 2,9	3,4 ± 4,0	65,1 ± 3,4*	6,3 ± 6,4	60,2 ± 9,9*	0,8
Fluorescencia roja	H	39,4 ± 10,4	35,4	39,6 ± 5,2	40,8 ± 9,3	30,9 ± 5,2	34,2 ± 4,1	33,4 ± 10,6	41,2 ± 5,7	41,2 ± 8,7	39,4
	C	58,6 ± 10,6	64	58,9 ± 5,7	57,8 ± 9,9	66,9 ± 4,3	64,3 ± 4,3	56,2 ± 8,1	52,9 ± 4,3	34,1 ± 19,4*	59,1
	N	2,0 ± 2,9	0,6	1,5 ± 1,2	1,4 ± 0,8	2,2 ± 2,4	1,5 ± 2,1	10,4 ± 7,6	5,9 ± 5,7	24,8 ± 21,1*	1,5
	Nº Celulas	1393	161	589	437	482	664	555	429	707	127




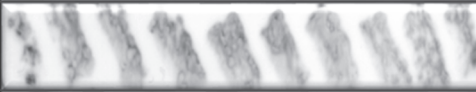

Fusión al dominio de unión a DNA de Gal4 (GBD)	Fusión al dominio de activación transcripcional de Gal4 (GAD)	Interacción de doble híbrido (Ensayo en filtro de β -galactosidasa)
GKRP	-----	
GKRP	GCK	
GKRP	GCK(L306R)	
GKRP	GCK(L309P)	
GKRP	GCK(L309H)	

Figura 39. Interacción entre la GCK y la GKRP mediante ensayo de doble híbrido en levadura. La interacción entre el híbrido del dominio de unión de Gal4(GBD)-GKRP y el dominio de activación transcripcional de Gal4(GAD)-GCK silvestre y mutantes, se estudió en la cepa Y187 de *Saccharomyces cerevisiae*. Los experimentos en filtro se llevaron a cabo con al menos ocho transformantes independientes para cada caso. En los experimentos control, el híbrido GBD-GKRP no interaccionó con GAD y el híbrido GAD-GCK no interaccionó con GBD (no mostrado). Además, se comprobó que las mutaciones no afectan a la estabilidad de las proteínas de fusión (no mostrado).

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos analizado ciertos aspectos de la regulación de la glucokinasa humana mediante la caracterización funcional de una serie de mutaciones naturales en el gen *GCK* identificadas en pacientes con patologías que cursan con alteraciones en la homeostasis de la glucemia. La caracterización funcional de mutaciones de este gen asociadas a patologías ha contribuido enormemente al conocimiento de la estructura-función de la glucokinasa (14, 60). La mayoría de las mutaciones aquí analizadas fueron identificadas en pacientes de hiperglucemia familiar MODY2, y en un caso de hipoglucemia por hiperinsulinismo. En la caracterización funcional de estas mutaciones hemos determinado los efectos causados sobre la actividad enzimática y la estructura proteica, que afectaría básicamente a todas las isoformas de glucokinasa expresadas en los distintos tipos celulares. Además hemos puesto especial énfasis en analizar los efectos causados por las mutaciones sobre la regulación de la localización núcleo-citoplásmica de la enzima, la cual afecta principalmente a su isoforma hepática.

Nuestros resultados nos han permitido concluir que estas mutaciones son las causantes de las correspondientes patologías y no polimorfismos silenciosos. Así se ha proporcionado un diagnóstico molecular, que confirma el clínico, con implicaciones en el seguimiento y tratamiento de los pacientes y sus familiares (55, 214).

1. Efecto de las mutaciones sobre la cinética enzimática y la estabilidad proteica.

Todas las mutaciones analizadas afectan a aminoácidos fuertemente conservados entre las glucocinasas de distintas especies. Nuestros resultados muestran que todas ellas alteran la actividad enzimática, afectando a los distintos parámetros cinéticos. Según el modelo matemático desarrollado por F. Matchinsky y colaboradores, las variaciones de actividad enzimática detectadas *in vitro* se traducen *in vivo* en la modificación del umbral de glucosa plasmática necesario para que las células β -pancreáticas secreten insulina (206). De esta manera, una disminución de la actividad glucocinasa supone un aumento del umbral de glucosa por encima de 5 mM y consecuentemente hiperglucemia, mientras que un aumento de actividad da lugar a la disminución del umbral de secreción por debajo de 5 mM y en consecuencia hipoglucemia por hiperinsulinismo (206). También se ha descrito que la inestabilidad proteica de los mutantes de glucocinasa, extrapolada desde ensayos de estabilidad en función de temperatura realizados *in vitro*, afecta a la patogénesis de MODY2 (213) y es un factor determinante de la gravedad del fenotipo clínico de pacientes de PNDM asociada a mutaciones de glucocinasa (215). Aplicando estos modelos a los resultados obtenidos, el efecto de las mutaciones sobre los parámetros cinéticos y sobre la estabilidad proteica justifican el fenotipo clínico de los individuos portadores de dichas mutaciones. No obstante, los efectos concretos producidos por las distintas mutaciones varían en función de la naturaleza del propio cambio de aminoácido, pero también de la localización del residuo afectado en la estructura proteica tridimensional de la glucocinasa.

1.1 Efecto de las mutaciones localizadas en el dominio menor sobre la cinética enzimática y la estabilidad proteica.

Como la mayoría de los residuos de la glucokinasa afectados por mutaciones activadoras, el Trp99 está situado en el dominio menor de la enzima, formando parte de la región bisagra y del sitio alostérico (60, 216). Al igual que otras mutaciones asociadas a HH-GCK, nuestros resultados confirman que la mutación W99C es una mutación activadora ya que, *in vitro*, la enzima mutante presenta un índice de actividad casi 12 veces superior al normal. Ya se había descrito anteriormente que otras mutaciones del residuo Trp99 (W99R, W99L) asociadas a HH-GCK producían un efecto fuertemente activador en la enzima, sin afectar a la regulación por GKAs ni por GKRP (73, 141, 217-220). Aunque en los individuos afectados por HH-GCK, la hipoglucemia es detectada generalmente desde el nacimiento, existe una cierta variabilidad en la gravedad clínica que a menudo refleja el efecto de la mutación sobre la actividad enzimática (221). Sin embargo, este no parece ser el caso de la mutación W99C, ya que el fenotipo del individuo afectado es leve (diagnóstico a los 25 años y normopeso al nacimiento; comunicación personal de L. Castaño, Tabla 2). Se han descrito otros casos en los que el aumento de inestabilidad proteica causada por una mutación contrarresta en parte la activación cinética producida (73, 218, 222, 223). Sin embargo, según nuestros resultados de estabilidad en función de la temperatura, este no es el caso de la mutación W99C, aunque no podemos descartar que otros factores genéticos o ambientales condicionen el estado patológico dando lugar a un fenotipo más leve.

Todas las demás mutaciones analizadas en este trabajo causan una disminución significativa en la actividad glucokinasa, hecho que, en base al modelo matemático (206),

justificaría el fenotipo MODY2 de los individuos portadores de dichas mutaciones. La mutación D409N, a pesar de estar localizada próxima al centro activo, aún conserva el 30% de actividad normal; la gran reducción del valor de la K_{cat} y de afinidad por ATP, es parcialmente compensada por un aumento de afinidad por glucosa. Aunque estructuralmente el Asp409 no estaría directamente implicado en la interacción con los sustratos (76, 222), su sustitución por asparagina podría distorsionar la posición de otros residuos del centro activo (Figuras 40B y 40C). Un efecto similar se había descrito para mutaciones del residuo próximo Ser411, en las que cambios a Ala o Leu (S411A o S411L), disminuían la K_{cat} al tiempo que aumentaban la afinidad por glucosa y el cambio a Phe (S411F) también disminuía la afinidad por el ATP (54, 224, 225). La mutación G246R, por el contrario, se encuentra muy alejada del centro activo pero ejerce un efecto negativo importante sobre la actividad enzimática. Este efecto podría ser debido a que la sustitución de Gly, aminoácido neutro y pequeño, por Arg, voluminoso y cargado, pudiera estabilizar la conformación abierta inactiva por interacción con otros residuos polares del entorno proteico (Figuras 40D a 40G).

No obstante, son la triple mutación L184I/G193R/A201P y la mutación A176E las que ejercen el mayor efecto sobre la actividad enzimática. Así las correspondientes proteínas GST-GCK mutantes presentaban menos del 1% de la actividad de referencia. Debido a la muy baja actividad de estos mutantes, los parámetros cinéticos calculados experimentalmente solo pueden considerarse aproximaciones. La Ala176 se encuentra en un bucle que cubre los aminoácidos 157 a 179, involucrado en la constitución del centro activo tras la transición hacia la conformación cerrada (76, 226). La mutación A176E introduce un residuo cargado negativamente que podría distorsionar esa región de la proteína, interfiriendo en el cambio conformacional requerido para la catálisis y

desestabilizando el sitio de unión a los sustratos (Figuras 40H y 40I), como sugieren la reducción de la K_{cat} y afinidad por sustratos, así como la pérdida de cooperatividad por glucosa observada en el mutante GST-GCK(A176E).

En el caso del triple mutante GST-GCK(G193R/L184I/A201P), la actividad enzimática es casi indetectable. Al analizar los efectos causados por cada mutación de manera independiente, observamos que las mutaciones L184I y G193R producían por sí mismas una pérdida de actividad enzimática superior al 80% y fuerte inestabilidad proteica. Estos efectos se podrían deber a impedimentos estéricos de las nuevas cadenas laterales (Figuras 40J a 40M). Sin embargo, la mutación A201P es la que mayor efecto inactivante produce. La sustitución concreta de la Ala201 a prolina es lo que causa la gran disminución de actividad enzimática, ya que otras mutaciones que afectan al mismo residuo (A201T y A201S) analizadas en este trabajo, A201V analizada anteriormente en nuestro laboratorio (O. Vincent, M.A. Navas y colaboradores, sin publicar), y A201R analizada por otros (77), causan una pérdida más moderada de actividad. La Ala201 forma parte de la lámina β -8, situada en la región bisagra, y junto a otros residuos de las láminas β -1 y β -6, constituyen un bolsillo hidrofóbico implicado en el cambio conformacional de la GCK durante la catálisis, por lo que las mutaciones que aumenten o disminuyan las interacciones apolares en este bolsillo hidrofóbico interferirían en dicho proceso (77). La disminuida capacidad de la prolina para establecer puentes de hidrógeno podría impedir la estabilización de la lámina β -8, mientras que las mutaciones A201T y A201S desestabilizarían las interacciones hidrofóbicas establecidas en el bolsillo (Figuras 40N a 40Q), como se describió para la mutación A201R (77).

La Thr60 se encuentra próxima al mismo bolsillo hidrofóbico, el cual es estabilizado por dos residuos polares Tyr61 y Asp158, por lo que la sustitución T60I, adyacente al residuo de Tyr61 podría provocar la desestabilización del bolsillo, y el choque de la cadena lateral de la Ile60 con la Cys252 (Figuras 40R y 40S), la cual forma parte de un anillo de cisteína fundamental para la estabilidad estructural de la glucokinasa (227).

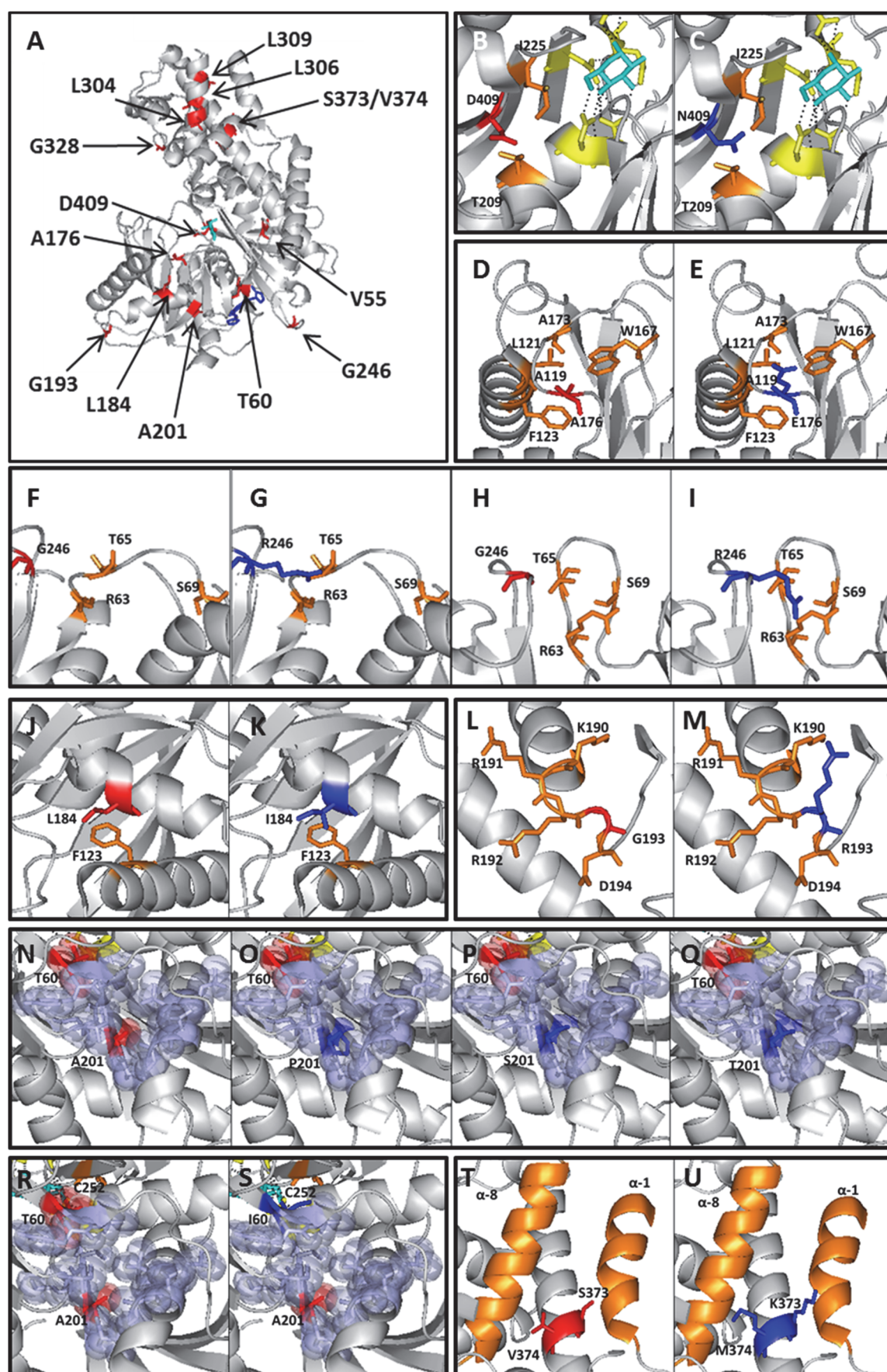
1.2 Efecto de las mutaciones localizadas en el dominio mayor.

Las mutaciones S373K/V374M y V55A provocan fuerte inestabilidad proteica. En el doble mutante, los residuos de Lys373 y Met374 serían proyectados hacia las hélices α -1 y α -8 respectivamente, desestabilizando la proteína (Figuras 40T y 40U). La baja eficiencia en la purificación de la correspondiente proteína mutante podría deberse a un incorrecto plegamiento *in vivo* durante la síntesis proteica, como ya se había descrito previamente para una triple mutación en la región equivalente de la glucokinasa de *Xenopus laevis* (E365G/S366V/T369K) que también resultaba ser insoluble e impedía el proceso de purificación desde bacterias (228).

La inestabilidad proteica del mutante GST-GCK(V55A), se refleja además en la fuerte inactivación que sufre a temperaturas superiores a 30°C. La Val55 se sitúa entre la hélice α -2 y la lámina β -1 formando parte del que, según algunos autores, es el primer bucle conector de los dos dominios de la proteína, el cual participa en la catálisis y la regulación alostérica (80).

De acuerdo con su ubicación alejada del centro activo, las mutaciones L304P, L306R, L309H y G328V, afectan moderadamente a las constantes de afinidad por los sustratos, siendo el efecto sobre la K_{cat} el principal factor de la pérdida de actividad de los respectivos mutantes. Los residuos Leu304, Leu306 y Leu309 forman parte de la hélice α -8. Nuestros resultados muestran que las mutaciones en estos residuos además de reducir la actividad catalítica, inducen la inactivación de la enzima tras someterla a la temperatura crítica de 50°C, y en algunos casos, bajo rendimiento de purificación desde bacterias. Estos resultados confirman que la hélice α -8, a pesar de estar alejada del centro activo y del sitio alostérico, es necesaria para la correcta actividad glucokinasa y también para su estabilidad proteica, como se había propuesto anteriormente (138, 168, 194, 206, 212).

Figura 40 (Página siguiente). Representación de las mutaciones MODY2 analizadas en el modelo estructural de la glucokinasa. Las estructuras proteicas (PDB, código IV4S, conformación cerrada y IV4T, conformación super-abierta) se han representado utilizando el programa *PyMOL*. A) Se muestra la proteína completa con los residuos analizados en rojo, la molécula de glucosa en azul claro y en azul oscuro el GKA MRK. Se muestran comparaciones de los residuos Asp409, Ala176, Gly246, Leu184, Gly193, Ala201, Thr60, Ser373 y Val374 (B, D, F, H, J, L, N, R y T, respectivamente) junto a sus correspondientes mutaciones (C, E, G, I, K, M, O, P, Q, S y U, respectivamente). En rojo se han representado los residuos normales de la proteína silvestre, y en azul por los que se han sustituido. Además se muestran como punteados negros las interacciones polares, en amarillo los residuos implicados en la interacción con glucosa según (222) y en naranja los residuos o estructuras secundarias que distorsionarían las nuevas cadenas laterales. Para la mutación G246R se representa la conformación cerrada de la glucokinasa (F y G) y la super-abierta (H y I). En N-S se ha representado el bolsillo hidrofóbico (transparencia violeta) formado por los residuos: Tyr61, Val62, Asp158, Ile159, Val200, Ala201, Met202, Val203, Leu451, Val452, Val455 y Ala456 según (77).



2. Efecto de las mutaciones MODY2 sobre la localización núcleo-citoplásmica.

Como ya se ha descrito en la Introducción, el principal mecanismo de regulación postraducciona de la glucokinasa hepática, y distinguible de la pancreática, es la regulación de su compartimentación núcleo-citoplásmica. Así en el periodo postprandial (alta concentración de glucosa y fructosa) la glucokinasa se hace necesaria y la enzima se encuentra activa en el citoplasma. Sin embargo durante el ayuno la glucokinasa es inhibida y secuestrada en el núcleo de los hepatocitos (137). Como cualquier molécula que exceda el tamaño de exclusión del poro nuclear, la glucokinasa requiere de la participación de un sistema especializado que la permita translocarse de un lado al otro de la membrana nuclear (160-162). Se ha propuesto que la secuencia de aminoácidos 300 a 310 conformarían una NES reconocible por la exportina 1/CRM1 (137). Sin embargo, no se ha localizado ninguna NLS en la enzima, siendo imprescindible su unión a GGRP para su entrada al núcleo (143, 229).

2.1 Efecto de las mutaciones sobre la interacción con la proteína reguladora GGRP.

Se ha demostrado en múltiples trabajos que la interacción de la glucokinasa con la GGRP es similar ya se trate de la isoforma hepática o pancreática, indicando que los 15 primeros aminoácidos del extremo amino terminal de la enzima no están implicados en la interacción (105, 228-231). Aunque diversos estudios han mostrado que mutaciones en distintas regiones proteicas de la glucokinasa, incluidos el sitio alostérico o la hélice α -8 afectaban a la interacción de la enzima con la GGRP (136-138, 194), la obtención de la estructura de heterodímeros GCK-GGRP cristalizados ha permitido limitar la región de contacto entre las dos proteínas a la región bisagra de la enzima (Figura 41) (130, 131).

Sin embargo, la información obtenida de estos trabajos procede del estudio de heterodímeros GCK-GKRP de *Xenopus laevis* en (130) o del híbrido de la GCK humana con la GKRP de rata en (131), pero no del heterodímero humano, debido a la dificultad de cristalizar la GKRP humana acomplejada a la glucokinasa (131). Si bien la glucokinasa de *Xenopus laevis* presenta un 82% de homología con la GCK humana (Figura 11), la homología de la GKRP de *Xenopus laevis* con la humana es tan solo del 58% (130). Aunque la homología entre la GKRP de rata y la humana es del 88%, se han observado claras diferencias en las propiedades reguladoras entre la GKRP de rata y la humana (195). En este trabajo hemos analizado el efecto de mutaciones concretas en la glucokinasa sobre la interacción con su proteína reguladora, siendo ambas proteínas de origen humano.

La unión de la GKRP a la glucokinasa no solo induce su translocación al núcleo celular, sino que también inhibe su actividad enzimática (12, 81). Por ello hemos analizado el efecto de las mutaciones sobre la interacción con la GKRP empleando tres abordajes complementarios: ensayos de inhibición enzimática de la glucokinasa por GKRP, ensayos de interacción proteína-proteína mediante ensayos de doble híbrido en levaduras y localización de las proteínas en células en cultivo mediante microscopía confocal. Hemos validado nuestros abordajes experimentales confirmando que la GCK es inhibida por la GKRP humana recombinante, cuyo protocolo de purificación se ha puesto a punto durante el desarrollo de este trabajo. También que la glucokinasa interacciona con su proteína reguladora en los ensayos de doble híbrido en levaduras y que la glucokinasa fusionada a GFP es detectada en el núcleo de células en cultivo únicamente en presencia de GKRP.

Nuestros resultados demuestran que las mutaciones que afectan a los residuos Thr60 y Ala201 de la glucokinasa interfieren en la interacción de ésta con su proteína reguladora y por tanto en la formación del heterodímero humano. Utilizando los distintos abordajes complementarios, hemos comprobado que las mutaciones MODY2 T60I, A201P y A201T impiden la interacción entre ambas proteínas, así como las sustituciones T60A y A201V (O. Vincent, M.A. Navas y colaboradores, sin publicar), y que la mutación A201S disminuye de manera significativa dicha interacción. Según los modelos estructurales de la glucokinasa, los residuos Thr60 y Ala201 quedan en la superficie proteica en la conformación super-abierta, mientras que en la conformación cerrada quedan enmascarados en el interior (Figura 41A). Si bien estos residuos, según las estructuras de los heterodímeros GCK-GKRP de *Xenopus laevis* o de mamífero, no establecen uniones directas con residuos de la GKRP, se encuentran inmersos en las superficies de contacto establecidas entre ambas proteínas (Figuras 41D y 41E) (130, 131). La Thr60 se encuentra entre los residuos Pro59 y Tyr61 que junto a la Val62 y la Lys143 forman parte del nicho hidrofóbico del dominio menor implicado en establecer contactos de Van der Waals con un lazo protuberante de la GKRP que comprende los residuos 462-470 (Figura 41D) (131). La Ala201 se encuentra adyacente a los residuos Val199 y Val200 que constituyen la superficie de interacción del dominio menor con los residuos Val441 y Gly442 de la proteína reguladora (Figura 41E) (131). De esta manera, las mutaciones de estos residuos pueden provocar alteraciones estructurales que desorganicen la superficie de interacción, impidiendo los contactos entre las dos proteínas (Figura 42).

Por otra parte, nuestros resultados indican que determinadas mutaciones de residuos que conforman la hélice α -8 de la glucokinasa, si bien no forman parte de la

superficie de contacto de la enzima con su proteína reguladora (Figura 41A) (131), pueden resultar en la alteración de la interacción entre las dos proteínas, como se había sugerido en otros estudios (138, 194). La sustitución de la Leu306 por un residuo básico, Arg en la mutación L306R ejerce un efecto fuertemente desestabilizante en la proteína, como sugiere el bajo rendimiento observado en la purificación del mutante GST-GCK(L306R) desde *E. coli*, su actividad enzimática casi indetectable además de la pérdida de reconocimiento por la GGRP. Un efecto similar había sido descrito para la misma sustitución de aminoácidos en una posición cercana, L309R (138). Las mutaciones L309H y L309P afectan al mismo residuo, sin embargo nuestros resultados muestran que la mutación L309H no altera la regulación de la GCK por su proteína reguladora pero si lo hace la mutación L309P. Aunque no hemos podido determinar el efecto que tiene la mutación L309P en la inhibición enzimática de la GCK por la GGRP debido a la baja actividad específica de este mutante (206), nuestros resultados muestran que la GGRP interacciona con el mutante GCK(L309P) en los ensayos de doble híbrido en levadura. Sin embargo, la proteína de fusión GFP-GCK(L309P) es detectada principalmente en el citoplasma y no en el núcleo de células en cultivo cotransfectadas con GGRP-mCherry. Una posible explicación a este comportamiento anómalo podría ser que la mutación L309P resultara en una NES más activa que exportara rápidamente al citoplasma toda la proteína mutada que entrase al núcleo. Sin embargo el análisis de la NES mutante, que se discute más adelante, así como la observación de que la leptomicina B no varía la localización citoplásmica del mutante GFP-GCK(L309P), nos permite descartar esta hipótesis. Otra posible explicación sería que la mutación induzca cambios estructurales que impidan el reconocimiento del mutante GFP-GCK(L309P) por GGRP-mCherry y así su entrada al núcleo celular. Sin embargo, el hecho de que en un porcentaje de células que

expresan GFP-GCK(L309P), la proteína GGRP-mCherry también sea colocalizada en el citoplasma, sugiere que pueda tener lugar el reconocimiento e interacción de ambas proteínas en este compartimento. Recientemente se ha descrito que la unión GCK-GGRP tiene lugar en dos etapas, primero se produce el reconocimiento y asociación de ambas proteínas y a continuación tiene lugar un ajuste conformacional que estabiliza el heterodímero (232). Es posible que la mutación L309P dificulte la segunda etapa, favoreciendo la disociación del heterodímero e impidiendo la translocación al núcleo. Alternativamente, no podemos descartar que el heterodímero formado por la proteína mutante GFP-GCK(L309P) y GGRP-mCherry sea estable pero no reconocido por la maquinaria de translocación al núcleo.

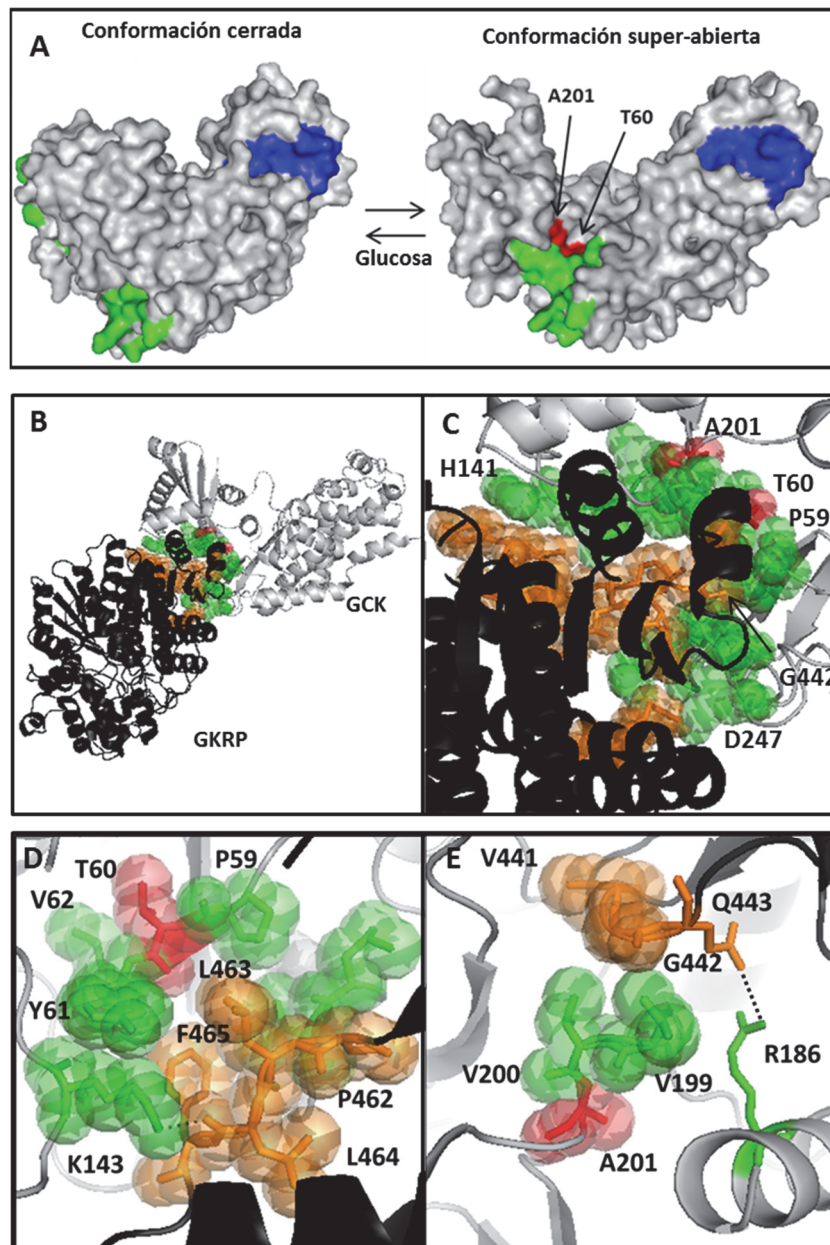
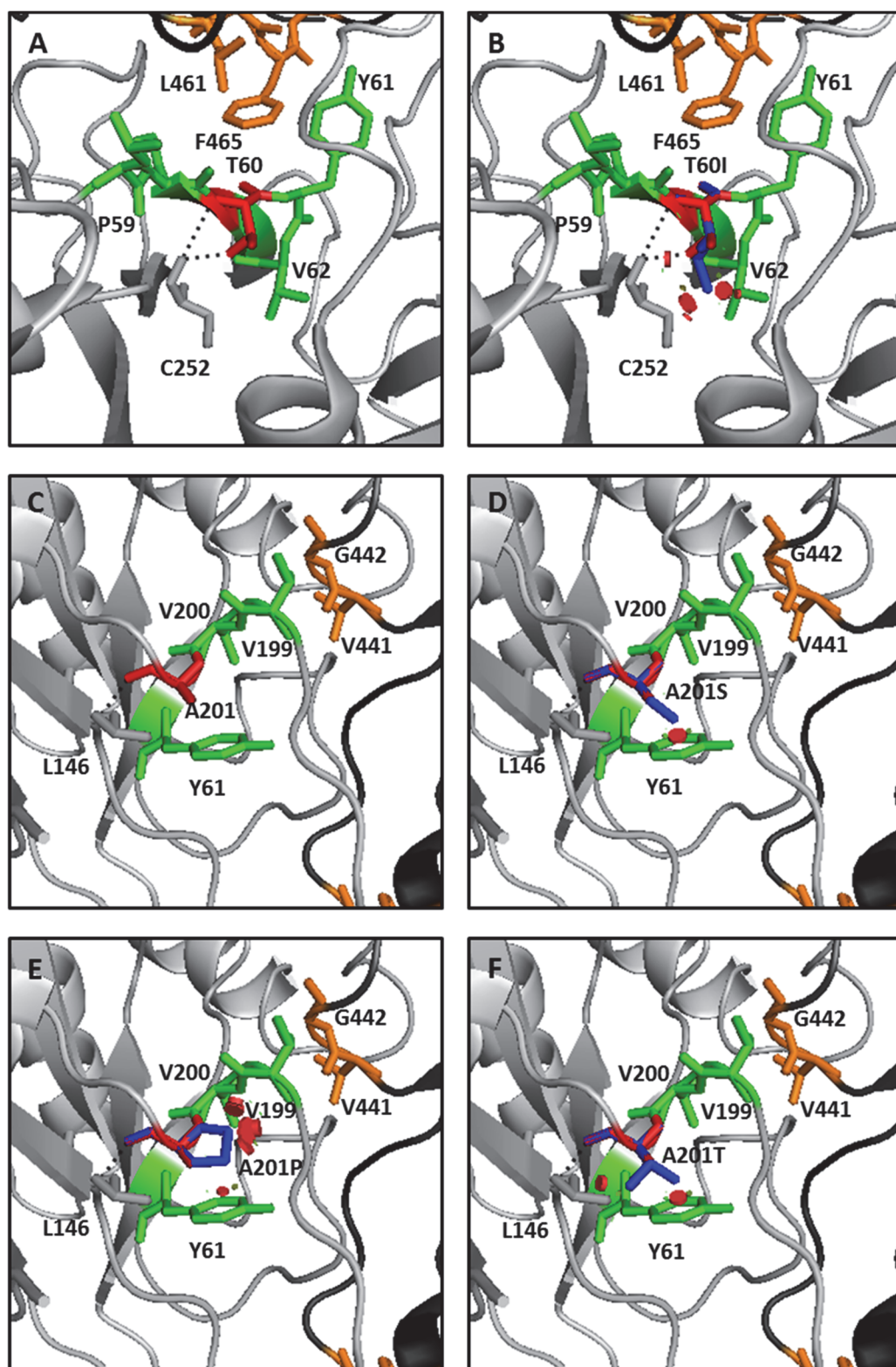


Figura 41. Representación de la interacción de la glucokinasa con la GKRP. Las estructuras proteicas (PDB, códigos IV4S, GCK en conformación cerrada y IV4T, GCK en conformación super-abierta, para A y 4LC9, heterodímero formado por GCK humana y GKRP de rata, para B, C, D y E) se han representado utilizando el programa *PyMOL*. La GCK se muestra en gris y la GKRP en negro. Los residuos analizados se muestran en rojo, los residuos de la glucokinasa y su proteína reguladora implicados en la interacción según (131) se muestran en verde y naranja respectivamente. A) Representación de la superficie de la GCK en su conformación cerrada y super-abierta, los residuos Thr60 y Ala201 están en la superficie de la proteína en su conformación inactiva mientras que quedan en el interior en la conformación cerrada, además en azul oscuro se ha representado la hélice α -8, la cual contiene la NES. B) Representación *Cartoon* del heterodímero GCK-GKRP cristalizado en (131). C) Ampliación de la superficie de interacción entre las proteínas GCK y GKRP. D y E) Ampliaciones de las regiones que contienen los residuos Thr60 y Ala201, respectivamente, en los nichos hidrofóbicos implicados en la interacción del heterodímero según (131).

Figura 42 (Página siguiente). Representación del efecto de las mutaciones de los residuos Thr60 y Ala201 en la estructura tridimensional de la glucokinasa alterando la superficie de interacción con GGRP. La estructura proteica del heterodímero GCK-GGRP de mamífero (PDB código 4LC9) se ha representado utilizando el programa *PyMOL*. La GCK se muestra en gris y la GGRP en negro. Los residuos analizados se muestran en rojo, los residuos de la glucokinasa y su proteína reguladora implicados en la interacción según (131) se muestran en verde y naranja respectivamente. A) y C) Ampliaciones de las regiones que contienen los residuos Thr60 y Ala201 respectivamente. B, D, E y F) Ampliaciones que muestran respectivamente las mutaciones T60I, A201S, A201P y A201T superpuestas en azul oscuro al residuo original. Los choques que se producen por dichas mutaciones se representan como discos rojos y las interacciones polares como punteados negros. Como se puede observar en B, la mutación T60I podría dar lugar a choques de la cadena lateral de isoleucina en posición 60 con la Val62, que forma parte de la superficie de interacción con GGRP. De forma análoga, en D, E y F, se aprecia que las tres mutaciones del residuo Ala201 podrían desestructurar la superficie de interacción con la GGRP debido a choques de las nuevas cadenas laterales con la Tyr61, además una prolina en la posición 201 podría alterar también la disposición tridimensional de Val199 y Val200.



2.2 Efecto de las mutaciones sobre la señal de exportación nuclear de la glucokinasa.

Como se ha mencionado anteriormente, es un hecho constatado que la entrada de la glucokinasa al núcleo celular es dependiente de su unión a GGRP. Por el contrario, el mecanismo por el cual la enzima es exportada desde el núcleo al citoplasma ha sido motivo de gran controversia debido, entre otros motivos, a las diversas opiniones sobre la implicación de la GGRP en el proceso (106, 121, 143, 146, 233). Actualmente, las evidencias experimentales apuntan a que la glucokinasa se exporta independientemente de GGRP ya que, se ha descrito que la disociación del complejo formado por la GCK y la GGRP precede a la salida de la enzima al citoplasma y que la translocación de la GCK es mediada por una secuencia rica en leucinas que cubre los residuos de aminoácido 300 a 310 y que actuaría como señal de exportación nuclear (NES) (137, 144, 158). En este trabajo hemos completado un estudio iniciado en nuestro laboratorio (García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168)) para analizar la función de la NES de la glucokinasa. Aquí hemos dilucidado el efecto de mutaciones MODY2, que implican cambios de aminoácidos ubicados en distintas posiciones críticas del consenso NES, sobre la actividad de exportación mediada por exportina 1/CRM1.

Debido a que para poder analizar la exportación nuclear de la glucokinasa, ésta debe haber entrado previamente al núcleo, y que esta entrada es dependiente de su interacción con GGRP, cualquier factor que altere la interacción entre ambas proteínas podría afectar a nuestras observaciones sin tener necesariamente que ver con la exportación en si misma (por ejemplo las mutaciones L306R y L309P discutidas anteriormente). Para evitar posibles conflictos, hemos centrado el estudio de las

mutaciones sobre la actividad de la NES de manera independiente de GKR. Para ello hemos recurrido a un sistema ampliamente utilizado en el estudio de las NES, en el que se analiza la distribución núcleo-citoplásmica de fusiones a GFP en cultivos celulares (234, 235). Concretamente en este trabajo, la proteína de fusión utilizada contiene los residuos 299 a 359 de la glucokinasa de rata fusionada al extremo amino terminal de la GFP, y que ya había sido previamente utilizada (137). La proteína de fusión obtenida, ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP posee un tamaño de 34 KDa, inferior al tamaño de exclusión del NPC (160), por lo que entra al núcleo por difusión, sin requerimiento de GKR. La presencia de una NES funcional favorece su transporte activo desde el núcleo al citoplasma.

Hemos confirmado que la NES contenida en la proteína de referencia ratgck⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾-GFP es funcional, que se mantiene con la sustitución K308R, presente en la NES de la GCK humana, pero que se inactiva con la triple mutación L306A/L307A/L309A presente en el mutante control mt3 (137), (García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168)). Además, hemos comprobado que la exportación nuclear de estas proteínas de fusión está mediada por exportina 1/CRM1, ya que se inhibe por el tratamiento con leptomicina B y se potencia con la sobreexpresión de CRM1.

La exportación nuclear de proteínas mediada por CRM1 es dependiente del reconocimiento de secuencias de aminoácidos que actúen como señales de exportación nuclear. Para que el proceso de exportación sea óptimo la unión de CRM1 a la proteína a exportar ha de ser relativamente débil y las NES han de poseer ciertas características estructurales (162, 236, 237). Clásicamente se ha considerado que las NES están compuestas por cuatro residuos hidrofóbicos que, junto a residuos espaciadores, forman una hélice anfipática con un consenso clásico ϕ -X_{2,3}- ϕ -X_{2,3}- ϕ -X- ϕ (161, 162, 166, 237,

238). En el caso de la glucokinasa, los residuos hidrofóbicos que actuarían en el reconocimiento de la enzima por parte de la exportina 1/CRM1 son las leucinas 301, 304, 307 y 309, que junto a los residuos espaciadores forman una NES de clase 1b (Figura 43) (167). Así las mutaciones MODY2 L304P, L309H y L309P afectan a dos de los cuatro residuos hidrofóbicos, mientras que las mutaciones E300Q, E300K, V302E, R303W, L306R y K308W afectan a residuos espaciadores. El análisis de las distintas mutaciones ha consistido en observar la distribución núcleo-citoplásmica de las proteínas de fusión a GFP mutantes y su dependencia de la actividad de exportina 1/CRM1. El efecto de la mutación L306R no ha podido determinarse con precisión, puesto que la expresión de la proteína *ratgck*⁽²⁹⁹⁻³⁵⁹⁾(L306R)-GFP resultaba en la formación de inclusiones fluorescentes que sugieren la formación de agregados proteicos, como se ha observado con otras proteínas (239). Este efecto, junto a otros causados por esta mutación y discutidos anteriormente, pone de manifiesto que la sustitución de la Leu306 por arginina induce graves defectos estructurales que impiden cualquier función de la glucokinasa.

Las leucinas 304 y 309 actúan como $\phi 2$ y $\phi 4$, respectivamente, en el consenso de reconocimiento de CRM1. La sustitución de la Leu309 por histidina o prolina, tan solo produce, si acaso, una leve pérdida de función. Es posible que las sustituciones de la Leu309 resulten en el reconocimiento de la Val310 como $\phi 4$, constituyendose así una NES menos eficiente, como se ha descrito para mutaciones de la NES del inhibidor de la PKA (167, 236). Por el contrario, la sustitución L304P inactiva la NES incluso en el contexto de una NES más activa (en combinación con E300K). Se ha demostrado que la estructura de las secuencias NES debe ser α helicoidal hasta el residuo $\phi 2$ y posteriormente, en la región que comprende los residuos $\phi 3$ y $\phi 4$, ha de ser más flexible

y extendida para permitir su reconocimiento por CRM1 (236). Así una prolina ocupando el lugar $\phi 2$ podría provocar una fuerte distorsión en la hélice α , que dificultaría su reconocimiento por la exportina 1 en mayor medida que cuando la prolina ocupa la posición $\phi 4$, como ocurre en la mutación L309P. La importancia del residuo de leucina ocupando la posición $\phi 2$ se subraya en la mutación L304P ya que su fuerte efecto inactivante no es compensado por la sobreexpresión de HA-CRM1.

Los residuos espaciadores que conforman la NES son importantes para la configuración tridimensional de esta y por lo tanto para el correcto reconocimiento por exportina 1/CRM1 (240). De hecho, nuestros resultados muestran que, mutaciones en el Glu300 (E300K y E300Q) aumentan la actividad exportadora de la NES, mientras que las mutaciones V302E y R303W la disminuyen.

Se ha sugerido que la presencia de residuos de Trp puede tener efectos distintos cuando se ubican entre las posiciones $\phi 3$ y $\phi 4$ o en posiciones espaciadoras anteriores (237). Las mutaciones R303W y K308W (equivalente a la mutación MODY2 R308W) sustituyen residuos espaciadores básicos por triptófano, hidrofóbico y voluminoso, con efectos distintos. La mutación R303W resulta en la disposición de 7 residuos apolares consecutivos, lo que elimina el carácter anfipático de la hélice y por lo tanto podría debilitar su reconocimiento por CRM1 en condiciones normales. En el caso de la mutación K308W hemos observado que se induce la acumulación de la proteína de fusión en la región perinuclear, confirmando observaciones anteriores de nuestro grupo de investigación (García-Herrero C.M. y Navas M.A. (168)). El efecto causado por la presencia de Trp en la posición 308 (ubicado entre $\phi 3$ y $\phi 4$) es similar al observado con

las NES suprafisiológicas que han incrementado su afinidad por distintos elementos del complejo de exportación como exportina 1/CRM1 y RanBP2 (241, 242).

También se ha descrito que la mayoría de las NES son ricas en aminoácidos ácidos (238) y que, en ciertos casos, los residuos de glutámico cercanos a $\phi 1$ mejoran su capacidad de exportación (236). Sin embargo, el efecto positivo provocado por las sustituciones del Glu300 en las mutaciones E300K y E300Q (residuo $\phi 1-1$) y el efecto negativo provocado por su aparición en la mutación V302E (residuo $\phi 1+1$) indican que la presencia de glutámico contiguo a la posición $\phi 1$ debilita la actividad de la NES de la glucokinasa. El hecho de que el residuo Glu300 module negativamente la actividad de la NES es consistente con el hecho de que la unión de las NES a la CRM1/exportina1 ha de ser relativamente débil para permitir el ensamblaje y desensamblaje de los complejos de exportación (162).

El estudio de las mutaciones MODY2 nos ha permitido analizar regiones de la glucokinasa, claves en la regulación de la enzima. Estas mutaciones alteran la actividad catalítica de la enzima y su estabilidad proteica, factores que afectan a cualquiera de las isoformas expresadas en los distintos tipos celulares. Además, algunas de ellas también pueden alterar la distribución subcelular de la GCK, que afecta fundamentalmente a la isoforma hepática. La caracterización funcional de las mutaciones ha permitido confirmar a nivel molecular, el diagnóstico clínico y genético de los pacientes portadores de las mutaciones. Además, ha permitido profundizar en el conocimiento molecular de la glucokinasa y aportar nuevos datos sobre la regulación de su distribución núcleo-citoplásmica, que en última instancia podrían ser de utilidad en el intento de desarrollar nuevas terapias antidiabéticas basadas en la modulación de la actividad glucokinasa.

	1	2	3	4
Consenso NES1b	Φ	XX	Φ	XX
GCK (298-312)	M	G	E	L
APC (66-80)	I	D	L	E
NS2 (10-25)	Q	D	I	L
NS1 (136-149)	S	V	I	F
IKB _ε (479-493)	E	S	V	L
IKB _α (43-57)	E	Q	M	V
Rna1P (317-331)	K	G	N	L
TFIIIA (326-339)	A	D	P	L
AhR (61-75)	I	N	K	L
Zyxin (318-332)	P	L	T	M
ICP27 (2-15)	A	T	D	I

Figura 43. Alineamiento de la secuencia de la NES de la glucokinasa frente a otras NES de tipo 1b. Se representa el consenso de las NES de tipo 1b junto a la NES de la glucokinasa y otras NES del mismo tipo obtenidas de la NESbase 1.0 (166). Se representa con letras rojas sobre fondo amarillo los residuos hidrofóbicos reconocidos por CRM1. La secuencia de aminoácidos de las distintas proteínas corresponde a la forma humana salvo para: NS1 y NS2 de Virus Influenza, TFIIIA de *Bufo americanus*, Rna1P de *Saccharomyces cerevisiae*, Zyxin de *Gallus gallus* e ICP27 de Herpes simplex.

CONCLUSIONES

- Todas las mutaciones analizadas en este trabajo alteran la actividad de la glucokinasa acorde con el fenotipo general de HH o de MODY2 de los pacientes en los que fueron identificadas. La mutación W99C, identificada en una paciente con HH es una mutación activadora, mientras que el resto inactivan a la enzima, justificando el fenotipo de MODY2.
- La mutación W99C activa a la enzima aumentando su constante catalítica, la afinidad por los sustratos y reduciendo la cooperatividad por glucosa.
- Todas las mutaciones MODY2 analizadas en este trabajo inactivan a la enzima afectando a los distintos parámetros cinéticos. Aunque los defectos concretos varían con la mutación, en términos generales, las mutaciones MODY2 disminuyen la afinidad de la enzima por sus sustratos y reducen la constante catalítica. Adicionalmente, algunas de las mutaciones MODY2 causan inestabilidad proteica.
- Mutaciones que implican residuos de aminoácidos ubicados en la región bisagra o en la hélice α -8 pueden afectar a la distribución núcleo-citoplásmica de la enzima.
 - Mutaciones de residuos ubicados en la región bisagra (Thr60 y Ala201) impiden la interacción de la glucokinasa con la GKRP humana y, en consecuencia, no permiten la entrada de la enzima al núcleo celular. Sin embargo, la falta de localización nuclear observada en los mutantes de glucokinasa portadores de mutaciones en la hélice α -8 (L306R o L309P) podría explicarse por desestabilización proteica.

- Mutaciones MODY2 que afectan a residuos de la hélice α -8 alteran la actividad de la señal de exportación nuclear de la glucokinasa. Los efectos causados varían con la naturaleza de la sustitución y su posición en la secuencia consenso de la NES. El residuo Glu300 modula negativamente la actividad de la NES, mientras que otros lo hacen de forma positiva, confirmando así la necesidad de una actividad suficiente pero equilibrada para permitir el correcto funcionamiento de la señal de exportación. Por otra parte, sustituciones puntuales de un único aminoácido, ya sea hidrofóbico o espaciador, no parecen suficientes para inactivar la NES, salvo en el caso de que esta sustitución desestabilice su estructura α -helicoidal (L304P).

BIBLIOGRAFÍA

1. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2013;36 Suppl 1:S67-74.
2. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice*. 2014;103(2):137-49.
3. American Diabetes Association <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/?loc=db-slabnav>.
4. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiu E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012;55(1):88-93.
5. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009;58(4):773-95.
6. Mittermayer F, Caveney E, De Oliveira C, Gourgiotis L, Puri M, Tai LJ, et al. Addressing unmet medical needs in type 2 diabetes: a narrative review of drugs under development. *Current diabetes reviews*. 2015;11(1):17-31.
7. Matschinsky FM, Magnuson MA, Zelent D, Jetton TL, Doliba N, Han Y, et al. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes*. 2006;55(1):1-12.
8. Sharma C, Manjeshwar R, Weinhouse S. Hormonal and dietary regulation of hepatic glucokinase. *Advances in Enzyme Regulation*. 1964;2:189-200.
9. Sols A, Salas M, Viñuela E. Induced biosynthesis of liver glucokinase. *Advances in Enzyme Regulation*. 1964;2:177-88.
10. Walker DG, Rao S. The role of glucokinase in the phosphorylation of glucose by rat liver. *The Biochemical journal*. 1964;90(2):360-8.
11. Matschinsky FM, Ellerman JE. Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *The Journal of biological chemistry*. 1968;243(10):2730-6.
12. Matschinsky FM. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(5):399-416.
13. Blazquez E, Velazquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:161.
14. Matschinsky FM. GKAs for diabetes therapy: why no clinically useful drug after two decades of trying? *Trends in pharmacological sciences*. 2013;34(2):90-9.
15. Prentki M, Matschinsky FM, Madiraju SR. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell metabolism*. 2013;18(2):162-85.
16. Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;296(5):E985-92.

17. Briant L, Salehi A, Vergari E, Zhang Q, Rorsman P. Glucagon secretion from pancreatic α -cells. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2016;121(2):113-119.
18. De Backer I, Hussain SS, Bloom SR, Gardiner JV. Insights into the role of neuronal glucokinase. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2016;311(1):E42-55.
19. Dunn-Meynell AA, Routh VH, Kang L, Gaspers L, Levin BE. Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes*. 2002;51(7):2056-65.
20. Kang L, Dunn-Meynell AA, Routh VH, Gaspers LD, Nagata Y, Nishimura T, et al. Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes*. 2006;55(2):412-20.
21. Kang L, Routh VH, Kuzhikandathil EV, Gaspers LD, Levin BE. Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes*. 2004;53(3):549-59.
22. Cherrington AD. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes*. 1999;48(5):1198-214.
23. Iynedjian PB. Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(1):27-42.
24. Takeuchi H, Inoue Y, Ishihara H, Oka Y. Overexpression of either liver type or pancreatic beta cell type glucokinase via recombinant adenovirus enhances glucose oxidation in isolated rat hepatocytes. *FEBS letters*. 1996;393(1):60-4.
25. Seoane J, Barbera A, Telemaque-Potts S, Newgard CB, Guinovart JJ. Glucokinase overexpression restores glucose utilization and storage in cultured hepatocytes from male Zucker diabetic fatty rats. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(45):31833-8.
26. Gomis RR, Ferrer JC, Guinovart JJ. Shared control of hepatic glycogen synthesis by glycogen synthase and glucokinase. *The Biochemical journal*. 2000;351 Pt 3:811-6.
27. Aiston S, Andersen B, Agius L. Glucose 6-phosphate regulates hepatic glycogenolysis through inactivation of phosphorylase. *Diabetes*. 2003;52(6):1333-9.
28. Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernandez-Novell JM, Garcia-Rocha M, de la Iglesia N, et al. Control of glycogen deposition. *FEBS letters*. 2003;546(1):127-32.
29. Sonnewald U. Glutamate synthesis has to be matched by its degradation - where do all the carbons go? *Journal of neurochemistry*. 2014;131(4):399-406.
30. Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma YH, Bauer M, Stewart TA. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell*. 1995;83(1):69-78.
31. Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(1):305-15.

32. Remedi MS, Koster JC, Patton BL, Nichols CG. ATP-sensitive K⁺ channel signaling in glucokinase-deficient diabetes. *Diabetes*. 2005;54(10):2925-31.
33. Bali D, Svetlanov A, Lee HW, Fusco-DeMane D, Leiser M, Li B, et al. Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(37):21464-7.
34. Ferre T, Riu E, Bosch F, Valera A. Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1996;10(10):1213-8.
35. Kim MY, Jo SH, Park JM, Kim TH, Im SS, Ahn YH. Adenovirus-mediated overexpression of Tcfe3 ameliorates hyperglycaemia in a mouse model of diabetes by upregulating glucokinase in the liver. *Diabetologia*. 2013;56(3):635-43.
36. Niswender KD, Shiota M, Postic C, Cherrington AD, Magnuson MA. Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(36):22570-5.
37. Shiota M, Postic C, Fujimoto Y, Jetton TL, Dixon K, Pan D, et al. Glucokinase gene locus transgenic mice are resistant to the development of obesity-induced type 2 diabetes. *Diabetes*. 2001;50(3):622-9.
38. Terauchi Y, Sakura H, Yasuda K, Iwamoto K, Takahashi N, Ito K, et al. Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(51):30253-6.
39. Porat S, Weinberg-Corem N, Tornovsky-Babaey S, Schyr-Ben-Haroush R, Hija A, Stolovich-Rain M, et al. Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell metabolism*. 2011;13(4):440-9.
40. Zhang YL, Tan XH, Xiao MF, Li H, Mao YQ, Yang X, et al. Establishment of liver specific glucokinase gene knockout mice: a new animal model for screening anti-diabetic drugs. *Acta pharmacologica Sinica*. 2004;25(12):1659-65.
41. O'Doherty RM, Lehman DL, Seoane J, Gomez-Foix AM, Guinovart JJ, Newgard CB. Differential metabolic effects of adenovirus-mediated glucokinase and hexokinase I overexpression in rat primary hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(34):20524-30.
42. Becker TC, Noel RJ, Johnson JH, Lynch RM, Hirose H, Tokuyama Y, et al. Differential effects of overexpressed glucokinase and hexokinase I in isolated islets. Evidence for functional segregation of the high and low K_m enzymes. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(1):390-4.
43. Ferre T, Pujol A, Riu E, Bosch F, Valera A. Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(14):7225-30.
44. Hariharan N, Farrelly D, Hagan D, Hillyer D, Arbeeney C, Sabrah T, et al. Expression of human hepatic glucokinase in transgenic mice liver results in decreased glucose levels and reduced body weight. *Diabetes*. 1997;46(1):11-6.

45. O'Doherty RM, Lehman DL, Telemaque-Potts S, Newgard CB. Metabolic impact of glucokinase overexpression in liver: lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia. *Diabetes*. 1999;48(10):2022-7.
46. Desai UJ, Slosberg ED, Boettcher BR, Caplan SL, Fanelli B, Stephan Z, et al. Phenotypic correction of diabetic mice by adenovirus-mediated glucokinase expression. *Diabetes*. 2001;50(10):2287-95.
47. Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, et al. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 1992;356(6365):162-4.
48. Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC, et al. Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet (London, England)*. 1992;339(8805):1307-10.
49. The Human Gene Mutation Database
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GCK>.
50. Hussain K. Mutations in pancreatic β -cell Glucokinase as a cause of hyperinsulinaemic hypoglycaemia and neonatal diabetes mellitus. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2010;11(3):179-83.
51. Fajans SS. Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes care*. 1990;13(1):49-64.
52. Owen KR. Monogenic diabetes: old and new approaches to diagnosis. *Clinical medicine (London, England)*. 2013;13(3):278-81.
53. Tallapragada DS, Bhaskar S, Chandak GR. New insights from monogenic diabetes for "common" type 2 diabetes. *Frontiers in genetics*. 2015;6:251.
54. Estalella I, Rica I, Perez de Nanclares G, Bilbao JR, Vazquez JA, San Pedro JI, et al. Mutations in GCK and HNF-1 α explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clinical endocrinology*. 2007;67(4):538-46.
55. Chakera AJ, Steele AM, Gloyn AL, Shepherd MH, Shields B, Ellard S, et al. Recognition and Management of Individuals With Hyperglycemia Because of a Heterozygous Glucokinase Mutation. *Diabetes care*. 2015;38(7):1383-92.
56. Steele AM, Wensley KJ, Ellard S, Murphy R, Shepherd M, Colclough K, et al. Use of HbA1c in the identification of patients with hyperglycaemia caused by a glucokinase mutation: observational case control studies. *PloS one*. 2013;8(6):e65326.
57. Pearson ER, Velho G, Clark P, Stride A, Shepherd M, Frayling TM, et al. beta-cell genes and diabetes: quantitative and qualitative differences in the pathophysiology of hepatic nuclear factor-1 α and glucokinase mutations. *Diabetes*. 2001;50 Suppl 1:S101-7.
58. Prisco F, Iafusco D, Franzese A, Sulli N, Barbetti F. MODY 2 presenting as neonatal hyperglycaemia: a need to reshape the definition of "neonatal diabetes"? *Diabetologia*. 2000;43(10):1331-2.
59. Steele AM, Shields BM, Wensley KJ, Colclough K, Ellard S, Hattersley AT. Prevalence of vascular complications among patients with glucokinase mutations and prolonged, mild hyperglycemia. *Jama*. 2014;311(3):279-86.

60. Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanne-Chantelot C, Ellard S, et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Human mutation*. 2009;30(11):1512-26.
61. Velho G, Petersen KF, Perseghin G, Hwang JH, Rothman DL, Pueyo ME, et al. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(8):1755-61.
62. Polak M, Shield J. Neonatal and very-early-onset diabetes mellitus. *Seminars in neonatology* : SN. 2004;9(1):59-65.
63. Miki T, Iwanaga T, Nagashima K, Ihara Y, Seino S. Roles of ATP-sensitive K⁺ channels in cell survival and differentiation in the endocrine pancreas. *Diabetes*. 2001;50 Suppl 1:S48-51.
64. Rubio-Cabezas O, Klupa T, Malecki MT. Permanent neonatal diabetes mellitus--the importance of diabetes differential diagnosis in neonates and infants. *European journal of clinical investigation*. 2011;41(3):323-33.
65. Slingerland AS, Shields BM, Flanagan SE, Bruining GJ, Noordam K, Gach A, et al. Referral rates for diagnostic testing support an incidence of permanent neonatal diabetes in three European countries of at least 1 in 260,000 live births. *Diabetologia*. 2009;52(8):1683-5.
66. Molven A, Ringdal M, Nordbo AM, Raeder H, Stoy J, Lipkind GM, et al. Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody-negative type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008;57(4):1131-5.
67. Boesgaard TW, Pruhova S, Andersson EA, Cinek O, Obermannova B, Lauenborg J, et al. Further evidence that mutations in INS can be a rare cause of Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY). *BMC medical genetics*. 2010;11:42.
68. de Lonlay P, Fournet JC, Touati G, Groos MS, Martin D, Sevin C, et al. Heterogeneity of persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia. A series of 175 cases. *European journal of pediatrics*. 2002;161(1):37-48.
69. Bruining GJ. Recent advances in hyperinsulinism and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Current Opinion in Pediatrics*. 1990;2(4):758-65.
70. Stanley CA. Hyperinsulinism in infants and children. *Pediatric clinics of North America*. 1997;44(2):363-74.
71. Arnoux JB, Verkarre V, Saint-Martin C, Montravers F, Brassier A, Valayannopoulos V, et al. Congenital hyperinsulinism: current trends in diagnosis and therapy. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011;6:63.
72. Rahman SA, Nessa A, Hussain K. Molecular mechanisms of congenital hyperinsulinism. *Journal of molecular endocrinology*. 2015;54(2):R119-29.
73. Gloyn AL, Noordam K, Willemsen MA, Ellard S, Lam WW, Campbell IW, et al. Insights into the biochemical and genetic basis of glucokinase activation from naturally occurring hypoglycemia mutations. *Diabetes*. 2003;52(9):2433-40.
74. Monod J, Wyman J, Changeux J-P. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology*. 1965;12(1):88-118.

75. Koshland DE, Jr., Nemethy G, Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*. 1966;5(1):365-85.
76. Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y. Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure (London, England : 1993)*. 2004;12(3):429-38.
77. Zhang J, Li C, Chen K, Zhu W, Shen X, Jiang H. Conformational transition pathway in the allosteric process of human glucokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(36):13368-73.
78. Larion M, Salinas RK, Bruschweiler-Li L, Bruschweiler R, Miller BG. Direct evidence of conformational heterogeneity in human pancreatic glucokinase from high-resolution nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*. 2010;49(37):7969-71.
79. Larion M, Miller BG. Homotropic allosteric regulation in monomeric mammalian glucokinase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;519(2):103-11.
80. Martinez JA, Larion M, Conejo MS, Porter CM, Miller BG. Role of connecting loop I in catalysis and allosteric regulation of human glucokinase. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2014;23(7):915-22.
81. Agius L. Hormonal and Metabolite Regulation of Hepatic Glucokinase. *Annual review of nutrition*. 2016;36:389-415.
82. Stoffel M, Le Beau MM, Espinosa R, 3rd, Bohlander SF, Le Paslier D, Cohen D, et al. A yeast artificial chromosome-based map of the region of chromosome 20 containing the diabetes-susceptibility gene, MODY1, and a myeloid leukemia related gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(9):3937-41.
83. Bedoya FJ, Matschinsky FM, Shimizu T, O'Neil JJ, Appel MC. Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of the rat. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(23):10760-4.
84. Liang Y, Najafi H, Matschinsky FM. Glucose regulates glucokinase activity in cultured islets from rat pancreas. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(28):16863-6.
85. Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR, et al. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Molecular cell*. 2001;7(3):559-70.
86. C F-M, M.S. G. Regulation of Glucokinase by Vitamins and Hormones. In: FM M, MA M, editors. *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics*. 16: Basel, Karger; 2004. p. 240-8.
87. da Silva Xavier G, Varadi A, Ainscow EK, Rutter GA. Regulation of gene expression by glucose in pancreatic beta -cells (MIN6) via insulin secretion and activation of phosphatidylinositol 3'-kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(46):36269-77.

88. Zelent D, Najafi H, Odili S, Buettger C, Weik-Collins H, Li C, et al. Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(Pt 1):306-10.
89. Roder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48:e219.
90. Yang H, Yang L. Targeting cAMP/PKA pathway for glycemic control and type 2 diabetes therapy. *Journal of molecular endocrinology*. 2016;57(2):R93-r108.
91. Ekman P, Nilsson E. Phosphorylation of glucokinase from rat liver in vitro by protein kinase A with a concomitant decrease of its activity. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1988;261(2):275-82.
92. Kemp BE, Pearson RB. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends in biochemical sciences*. 1990;15(9):342-6.
93. Munoz-Alonso MJ, Guillemain G, Kassis N, Girard J, Burnol AF, Leturque A. A novel cytosolic dual specificity phosphatase, interacting with glucokinase, increases glucose phosphorylation rate. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(42):32406-12.
94. M. T, S. B, S. L. Role of Sulfhydryl Groups in GK Catalysis for GK Function. In: FM M, MA M, editors. *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics*. 16: Basel, Karger; 2004. p. 275-88.
95. Rizzo MA, Piston DW. Regulation of beta cell glucokinase by S-nitrosylation and association with nitric oxide synthase. *The Journal of cell biology*. 2003;161(2):243-8.
96. Verger A, Perdomo J, Crossley M. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO reports*. 2003;4(2):137-42.
97. Bjorkhaug L, Molnes J, Sovik O, Njolstad PR, Flatmark T. Allosteric activation of human glucokinase by free polyubiquitin chains and its ubiquitin-dependent cotranslational proteasomal degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(31):22757-64.
98. Hofmeister-Brix A, Lenzen S, Baltrusch S. The ubiquitin-proteasome system regulates the stability and activity of the glucose sensor glucokinase in pancreatic beta-cells. *The Biochemical journal*. 2013;456(2):173-84.
99. Aukrust I, Bjorkhaug L, Negahdar M, Molnes J, Johansson BB, Muller Y, et al. SUMOylation of pancreatic glucokinase regulates its cellular stability and activity. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(8):5951-62.
100. Tippet PS, Neet KE. An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(21):12846-52.
101. Hue L, Maisin L, Rider MH. Palmitate inhibits liver glycolysis. Involvement of fructose 2,6-bisphosphate in the glucose/fatty acid cycle. *The Biochemical journal*. 1988;251(2):541-5.
102. Grimsby J, Sarabu R, Corbett WL, Haynes NE, Bizzarro FT, Coffey JW, et al. Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science (New York, NY)*. 2003;301(5631):370-3.

103. Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*. 2003;424(6951):952-6.
104. Massa L, Baltrusch S, Okar DA, Lange AJ, Lenzen S, Tiedge M. Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes*. 2004;53(4):1020-9.
105. Vandercammen A, Van Schaftingen E. Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1991;200(2):545-51.
106. Toyoda Y, Yoshie S, Shironoguchi H, Miwa I. Glucokinase is concentrated in insulin-secreting granules of pancreatic B-cells. *Histochemistry and cell biology*. 1999;112(1):35-40.
107. Stubbs M, Aiston S, Agius L. Subcellular localization, mobility, and kinetic activity of glucokinase in glucose-responsive insulin-secreting cells. *Diabetes*. 2000;49(12):2048-55.
108. Lajoix AD, Reggio H, Chardes T, Peraldi-Roux S, Tribillac F, Roye M, et al. A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic beta-cells controls insulin secretion. *Diabetes*. 2001;50(6):1311-23.
109. Rizzo MA, Magnuson MA, Drain PF, Piston DW. A functional link between glucokinase binding to insulin granules and conformational alterations in response to glucose and insulin. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(37):34168-75.
110. Danial NN, Walensky LD, Zhang CY, Choi CS, Fisher JK, Molina AJ, et al. Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nature medicine*. 2008;14(2):144-53.
111. Szlyk B, Braun CR, Ljubicic S, Patton E, Bird GH, Osundiji MA, et al. A phospho-BAD BH3 helix activates glucokinase by a mechanism distinct from that of allosteric activators. *Nature structural & molecular biology*. 2014;21(1):36-42.
112. Gimenez-Cassina A, Garcia-Haro L, Choi CS, Osundiji MA, Lane EA, Huang H, et al. Regulation of hepatic energy metabolism and gluconeogenesis by BAD. *Cell metabolism*. 2014;19(2):272-84.
113. Plas DR, Thompson CB. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2002;13(2):75-8.
114. Ljubicic S, Polak K, Fu A, Wiwczar J, Szlyk B, Chang Y, et al. Phospho-BAD BH3 mimicry protects beta cells and restores functional beta cell mass in diabetes. *Cell reports*. 2015;10(4):497-504.
115. Hedrich R, Raschke K, Stitt M. A role for fructose 2,6-bisphosphate in regulating carbohydrate metabolism in guard cells. *Plant physiology*. 1985;79(4):977-82.
116. Lenzen S. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(18):12189-94.
117. Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabate A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26(1):30-5.

118. Smith WE, Langer S, Wu C, Baltrusch S, Okar DA. Molecular coordination of hepatic glucose metabolism by the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase:glucokinase complex. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md). 2007;21(6):1478-87.
119. Langer S, Kaminski MT, Lenzen S, Baltrusch S. Endogenous activation of glucokinase by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase is glucose dependent. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md). 2010;24(10):1988-97.
120. Payne VA, Arden C, Wu C, Lange AJ, Agius L. Dual role of phosphofructokinase-2/fructose bisphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes. *Diabetes*. 2005;54(7):1949-57.
121. Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *The Biochemical journal*. 2008;414(1):1-18.
122. Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Vazquez P, Blazquez E. Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. *Journal of neurochemistry*. 2002;80(1):45-53.
123. Roncero I, Sanz C, Alvarez E, Vazquez P, Barrio PA, Blazquez E. Glucokinase and glucokinase regulatory proteins are functionally coexpressed before birth in the rat brain. *Journal of neuroendocrinology*. 2009;21(12):973-81.
124. Beer NL, Tribble ND, McCulloch LJ, Roos C, Johnson PR, Orho-Melander M, et al. The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Human molecular genetics*. 2009;18(21):4081-8.
125. Van Schaftingen E. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1989;179(1):179-84.
126. Bontemps F, Hue L, Hers HG. Phosphorylation of glucose in isolated rat hepatocytes. Sigmoidal kinetics explained by the activity of glucokinase alone. *The Biochemical journal*. 1978;174(2):603-11.
127. Clark DG, Filsell OH, Topping DL. Effects of fructose concentration on carbohydrate metabolism, heat production and substrate cycling in isolated rat hepatocytes. *The Biochemical journal*. 1979;184(3):501-7.
128. Vandercammen A, Detheux M, Van Schaftingen E. Binding of sorbitol 6-phosphate and of fructose 1-phosphate to the regulatory protein of liver glucokinase. *The Biochemical journal*. 1992;286 (Pt 1):253-6.
129. Veiga-da-Cunha M, Van Schaftingen E. Identification of fructose 6-phosphate- and fructose 1-phosphate-binding residues in the regulatory protein of glucokinase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(10):8466-73.
130. Choi JM, Seo MH, Kyeong HH, Kim E, Kim HS. Molecular basis for the role of glucokinase regulatory protein as the allosteric switch for glucokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(25):10171-6.
131. Beck T, Miller BG. Structural basis for regulation of human glucokinase by glucokinase regulatory protein. *Biochemistry*. 2013;52(36):6232-9.

132. Van Schaftingen E, Detheux M, Veiga da Cunha M. Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1994;8(6):414-9.
133. Veiga-da-Cunha M, Sokolova T, Oppendoes F, Van Schaftingen E. Evolution of vertebrate glucokinase regulatory protein from a bacterial N-acetylmuramate 6-phosphate etherase. *The Biochemical journal*. 2009;423(3):323-32.
134. Lloyd DJ, St Jean DJ, Jr., Kurzeja RJ, Wahl RC, Michelsen K, Cupples R, et al. Antidiabetic effects of glucokinase regulatory protein small-molecule disruptors. *Nature*. 2013;504(7480):437-40.
135. Pautsch A, Stadler N, Lohle A, Rist W, Berg A, Glocker L, et al. Crystal structure of glucokinase regulatory protein. *Biochemistry*. 2013;52(20):3523-31.
136. Moukil MA, Veiga-da-Cunha M, Van Schaftingen E. Study of the regulatory properties of glucokinase by site-directed mutagenesis: conversion of glucokinase to an enzyme with high affinity for glucose. *Diabetes*. 2000;49(2):195-201.
137. Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA. Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(52):37125-30.
138. Baltrusch S, Francini F, Lenzen S, Tiedge M. Interaction of glucokinase with the liver regulatory protein is conferred by leucine-asparagine motifs of the enzyme. *Diabetes*. 2005;54(10):2829-37.
139. Anderka O, Boyken J, Aschenbach U, Batzer A, Boscheinen O, Schmoll D. Biophysical characterization of the interaction between hepatic glucokinase and its regulatory protein: impact of physiological and pharmacological effectors. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(46):31333-40.
140. Futamura M, Hosaka H, Kadotani A, Shimazaki H, Sasaki K, Ohyama S, et al. An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(49):37668-74.
141. Zelent B, Odili S, Buettger C, Zelent DK, Chen P, Fenner D, et al. Mutational analysis of allosteric activation and inhibition of glucokinase. *The Biochemical journal*. 2011;440(2):203-15.
142. Brown KS, Kalinowski SS, Megill JR, Durham SK, Mookhtiar KA. Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes*. 1997;46(2):179-86.
143. de la Iglesia N, Veiga-da-Cunha M, Van Schaftingen E, Guinovart JJ, Ferrer JC. Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS letters*. 1999;456(2):332-8.
144. Jin L, Guo T, Li Z, Lei Z, Li H, Mao Y, et al. Role of glucokinase in the subcellular localization of glucokinase regulatory protein. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(4):7377-93.
145. Farrelly D, Brown KS, Tieman A, Ren J, Lira SA, Hagan D, et al. Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a

- sequestration mechanism in metabolic regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(25):14511-6.
146. Mukhtar M, Stubbs M, Agius L. Evidence for glucose and sorbitol-induced nuclear export of glucokinase regulatory protein in hepatocytes. *FEBS letters*. 1999;462(3):453-8.
147. Grimsby J, Coffey JW, Dvorozniak MT, Magram J, Li G, Matschinsky FM, et al. Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(11):7826-31.
148. Jetton TL, Shiota M, Knobel SM, Piston DW, Cherrington AD, Magnuson MA. Substrate-induced Nuclear Export and Peripheral Compartmentalization of Hepatic Glucokinase Correlates with Glycogen Deposition. *International Journal of Experimental Diabetes Research*. 2001;2(3).
149. Rees MG, Ng D, Ruppert S, Turner C, Beer NL, Swift AJ, et al. Correlation of rare coding variants in the gene encoding human glucokinase regulatory protein with phenotypic, cellular, and kinetic outcomes. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(1):205-17.
150. Rees MG, Wincovitch S, Schultz J, Waterstradt R, Beer NL, Baltrusch S, et al. Cellular characterisation of the GCKR P446L variant associated with type 2 diabetes risk. *Diabetologia*. 2012;55(1):114-22.
151. Rees MG, Davis MI, Shen M, Titus S, Raimondo A, Barrett A, et al. A panel of diverse assays to interrogate the interaction between glucokinase and glucokinase regulatory protein, two vital proteins in human disease. *PloS one*. 2014;9(2):e89335.
152. Rees MG, Raimondo A, Wang J, Ban MR, Davis MI, Barrett A, et al. Inheritance of rare functional GCKR variants and their contribution to triglyceride levels in families. *Human molecular genetics*. 2014;23(20):5570-8.
153. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science (New York, NY)*. 2007;316(5829):1331-6.
154. Orho-Melander M, Melander O, Guiducci C, Perez-Martinez P, Corella D, Roos C, et al. Common missense variant in the glucokinase regulatory protein gene is associated with increased plasma triglyceride and C-reactive protein but lower fasting glucose concentrations. *Diabetes*. 2008;57(11):3112-21.
155. Zain SM, Mohamed Z, Mohamed R. Common variant in the glucokinase regulatory gene rs780094 and risk of nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30(1):21-7.
156. Mukhtar MH, Payne VA, Arden C, Harbottle A, Khan S, Lange AJ, et al. Inhibition of glucokinase translocation by AMP-activated protein kinase is associated with phosphorylation of both GKRP and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;294(3):R766-74.
157. Antoine M, Boutin JA, Ferry G. Binding kinetics of glucose and allosteric activators to human glucokinase reveal multiple conformational states. *Biochemistry*. 2009;48(23):5466-82.

158. Kaminski MT, Schultz J, Waterstradt R, Tiedge M, Lenzen S, Baltrusch S. Glucose-induced dissociation of glucokinase from its regulatory protein in the nucleus of hepatocytes prior to nuclear export. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843(3):554-64.
159. Cullen KS, Al-Oanzi ZH, O'Harte FP, Agius L, Arden C. Glucagon induces translocation of glucokinase from the cytoplasm to the nucleus of hepatocytes by transfer between 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase-2 and the glucokinase regulatory protein. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843(6):1123-34.
160. Nigg EA. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*. 1997;386(6627):779-87.
161. Pante N, Aebi U. The nuclear pore complex. *The Journal of cell biology*. 1993;122(5):977-84.
162. Kutay U, Guttinger S. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends in cell biology*. 2005;15(3):121-4.
163. Cook A, Bono F, Jinek M, Conti E. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annual review of biochemistry*. 2007;76:647-71.
164. Ishizawa J, Kojima K, Hail N, Jr., Tabe Y, Andreeff M. Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein. *Pharmacology & therapeutics*. 2015;153:25-35.
165. Hutten S, Kehlenbach RH. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in cell biology*. 2007;17(4):193-201.
166. la Cour T, Gupta R, Rapacki K, Skriver K, Poulsen FM, Brunak S. NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic acids research*. 2003;31(1):393-6.
167. Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H. Nuclear export signal consensus sequences defined using a localization-based yeast selection system. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2008;9(12):2053-62.
168. García-Herrero CM. Análisis de la regulación de la glucoquinasa humana a partir del estudio de mutaciones asociadas a hipoglucemia y diabetes monogénica. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. 2012. eprints.ucm.es/16338/1/T33934.pdf
169. Caro JF, Triester S, Patel VK, Tapscott EB, Frazier NL, Dohm GL. Liver glucokinase: decreased activity in patients with type II diabetes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 1995;27(1):19-22.
170. Filipski KJ, Pfefferkorn JA. A patent review of glucokinase activators and disruptors of the glucokinase--glucokinase regulatory protein interaction: 2011-2014. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2014;24(8):875-91.
171. Ralph EC, Thomson J, Almaden J, Sun S. Glucose modulation of glucokinase activation by small molecules. *Biochemistry*. 2008;47(17):5028-36.
172. Nakamura A, Terauchi Y. Present status of clinical deployment of glucokinase activators. *J Diabetes Investig*. 2015;6(2):124-32.

173. Nakamura A, Terauchi Y, Ohyama S, Kubota J, Shimazaki H, Nambu T, et al. Impact of small-molecule glucokinase activator on glucose metabolism and beta-cell mass. *Endocrinology*. 2009;150(3):1147-54.
174. Coope GJ, Atkinson AM, Allott C, McKerrecher D, Johnstone C, Pike KG, et al. Predictive blood glucose lowering efficacy by Glucokinase activators in high fat fed female Zucker rats. *British journal of pharmacology*. 2006;149(3):328-35.
175. Efanov AM, Barrett DG, Brenner MB, Briggs SL, Delaunois A, Durbin JD, et al. A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function. *Endocrinology*. 2005;146(9):3696-701.
176. Futamura M, Yao J, Li X, Bergeron R, Tran JL, Zycband E, et al. Chronic treatment with a glucokinase activator delays the onset of hyperglycaemia and preserves beta cell mass in the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetologia*. 2012;55(4):1071-80.
177. Fyfe MC, White JR, Taylor A, Chatfield R, Wargent E, Printz RL, et al. Glucokinase activator PSN-GK1 displays enhanced antihyperglycaemic and insulinotropic actions. *Diabetologia*. 2007;50(6):1277-87.
178. Ohyama S, Takano H, Iino T, Nishimura T, Zhou YP, Langdon RB, et al. A small-molecule glucokinase activator lowers blood glucose in the sulfonylurea-desensitized rat. *European journal of pharmacology*. 2010;640(1-3):250-6.
179. Bonadonna RC, Heise T, Arbet-Engels C, Kapitza C, Avogaro A, Grimsby J, et al. Piragliatin (RO4389620), a novel glucokinase activator, lowers plasma glucose both in the postabsorptive state and after a glucose challenge in patients with type 2 diabetes mellitus: a mechanistic study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(11):5028-36.
180. Meininger GE, Scott R, Alba M, Shentu Y, Luo E, Amin H, et al. Effects of MK-0941, a novel glucokinase activator, on glycemic control in insulin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2011;34(12):2560-6.
181. Sarabu R, Bizzarro FT, Corbett WL, Dvorozniak MT, Geng W, Grippo JF, et al. Discovery of piragliatin--first glucokinase activator studied in type 2 diabetic patients. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(16):7021-36.
182. Wilding JP, Leonsson-Zachrisson M, Wessman C, Johnsson E. Dose-ranging study with the glucokinase activator AZD1656 in patients with type 2 diabetes mellitus on metformin. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013;15(8):750-9.
183. Pfefferkorn JA, Guzman-Perez A, Oates PJ, Litchfield J, Aspnes G, Basak A, et al. Designing glucokinase activators with reduced hypoglycemia risk: Discovery of N,N-dimethyl-5-(2-methyl-6-((5-methylpyrazin-2-yl)-carbamoyl)benzofuran-4-yl)oxy)pyrimidine-2-carboxamide as a clinical candidate for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *MedChemComm*. 2011;2(9):828-39.
184. Amin NB, Aggarwal N, Pall D, Paragh G, Denney WS, Le V, et al. Two dose-ranging studies with PF-04937319, a systemic partial activator of glucokinase, as add-on therapy to metformin in adults with type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2015;17(8):751-9.
185. Pfefferkorn JA. Strategies for the design of hepatoselective glucokinase activators to treat type 2 diabetes. *Expert opinion on drug discovery*. 2013;8(3):319-30.

186. Pfefferkorn JA, Guzman-Perez A, Litchfield J, Aiello R, Treadway JL, Pettersen J, et al. Discovery of (S)-6-(3-cyclopentyl-2-(4-(trifluoromethyl)-1H-imidazol-1-yl)propanamido)nicotinic acid as a hepatoselective glucokinase activator clinical candidate for treating type 2 diabetes mellitus. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(3):1318-33.
187. Stevens BD, Litchfield J, Pfefferkorn JA, Atkinson K, Perreault C, Amor P, et al. Discovery of an intravenous hepatoselective glucokinase activator for the treatment of inpatient hyperglycemia. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(24):6588-92.
188. Erion DM, Lapworth A, Amor PA, Bai G, Vera NB, Clark RW, et al. The hepatoselective glucokinase activator PF-04991532 ameliorates hyperglycemia without causing hepatic steatosis in diabetic rats. *PloS one*. 2014;9(5):e97139.
189. Hale C, Lloyd DJ, Pellacani A, Veniant MM. Molecular targeting of the GK-GKRP pathway in diabetes. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2015;19(1):129-39.
190. Ashton KS, Andrews KL, Bryan MC, Chen J, Chen K, Chen M, et al. Small molecule disruptors of the glucokinase-glucokinase regulatory protein interaction: 1. Discovery of a novel tool compound for in vivo proof-of-concept. *Journal of medicinal chemistry*. 2014;57(2):309-24.
191. Tamayo NA, Norman MH, Bartberger MD, Hong FT, Bo Y, Liu L, et al. Small Molecule Disruptors of the Glucokinase-Glucokinase Regulatory Protein Interaction: 5. A Novel Aryl Sulfone Series, Optimization Through Conformational Analysis. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;58(11):4462-82.
192. Pennington LD, Bartberger MD, Croghan MD, Andrews KL, Ashton KS, Bourbeau MP, et al. Discovery and Structure-Guided Optimization of Diarylmethanesulfonamide Disruptors of Glucokinase-Glucokinase Regulatory Protein (GK-GKRP) Binding: Strategic Use of a N → S (nN → sigma*S-X) Interaction for Conformational Constraint. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;58(24):9663-79.
193. Capuano M, Garcia-Herrero CM, Tinto N, Carluccio C, Capobianco V, Coto I, et al. Glucokinase (GCK) mutations and their characterization in MODY2 children of southern Italy. *PloS one*. 2012;7(6):e38906.
194. Garcia-Herrero CM, Galan M, Vincent O, Flandez B, Gargallo M, Delgado-Alvarez E, et al. Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia*. 2007;50(2):325-33.
195. Brocklehurst KJ, Davies RA, Agius L. Differences in regulatory properties between human and rat glucokinase regulatory protein. *The Biochemical journal*. 2004;378(Pt 2):693-7.
196. Garcia-Herrero CM, Rubio-Cabezas O, Azriel S, Gutierrez-Nogues A, Aragonés A, Vincent O, et al. Functional characterization of MODY2 mutations highlights the importance of the fine-tuning of glucokinase and its role in glucose sensing. *PloS one*. 2012;7(1):e30518.
197. Garin I, Rica I, Estalella I, Oyarzabal M, Rodriguez-Rigual M, San Pedro JI, et al. Haploinsufficiency at GCK gene is not a frequent event in MODY2 patients. *Clinical endocrinology*. 2008;68(6):873-8.

198. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, et al. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. 1993;328(10):697-702.
199. Losekoot M, Broekman AJ, Breuning MH, de Koning EJ, Romijn JA, Maassen JA. [Molecular diagnosis on indication of maturity onset diabetes of the young; results from 184 patients]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 2005;149(3):139-43.
200. Ziemssen F, Bellanne-Chantelot C, Osterhoff M, Schatz H, Pfeiffer AF. To: Lindner T, Cockburn BN, Bell GI (1999). Molecular genetics of MODY in Germany. *Diabetologia* 42: 121-123. *Diabetologia*. 2002;45(2):286-7; author reply 7-8.
201. D H. Techniques for transformation of *E. coli*. Oxford, United Kingdom: IRL Press. 1985;1:27.
202. Sambrook J, Russell D. Molecular cloning. A laboratory manual. 2001.
203. Yang X, Hubbard EJ, Carlson M. A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science (New York, NY)*. 1992;257(5070):680-2.
204. Liang Y, Kesavan P, Wang LQ, Niswender K, Tanizawa Y, Permutt MA, et al. Variable effects of maturity-onset-diabetes-of-youth (MODY)-associated glucokinase mutations on substrate interactions and stability of the enzyme. *The Biochemical journal*. 1995;309 (Pt 1):167-73.
205. Pilkis SJ. Glucokinase of rat liver. *Methods in enzymology*. 1975;42:31-9.
206. Davis EA, Cuesta-Munoz A, Raoul M, Buettger C, Sweet I, Moates M, et al. Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and hyperglycaemia syndromes and their analysis illuminates fundamental quantitative concepts of glucose homeostasis. *Diabetologia*. 1999;42(10):1175-86.
207. Salas J, Salas M, Vinuela E, Sols A. GLUCOKINASE OF RABBIT LIVER. *The Journal of biological chemistry*. 1965;240:1014-8.
208. Christesen HB, Jacobsen BB, Odili S, Buettger C, Cuesta-Munoz A, Hansen T, et al. The second activating glucokinase mutation (A456V): implications for glucose homeostasis and diabetes therapy. *Diabetes*. 2002;51(4):1240-6.
209. Brocklehurst KJ, Payne VA, Davies RA, Carroll D, Vertigan HL, Wightman HJ, et al. Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators. *Diabetes*. 2004;53(3):535-41.
210. Oriola J, Moreno F, Gutierrez-Nogues A, Leon S, Garcia-Herrero CM, Vincent O, et al. Lack of glibenclamide response in a case of permanent neonatal diabetes caused by incomplete inactivation of glucokinase. *JIMD reports*. 2015;20:21-6.
211. Pino MF, Kim KA, Shelton KD, Lindner J, Odili S, Li C, et al. Glucokinase thermolability and hepatic regulatory protein binding are essential factors for predicting the blood glucose phenotype of missense mutations. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(18):13906-16.
212. Gidh-Jain M, Takeda J, Xu LZ, Lange AJ, Vionnet N, Stoffel M, et al. Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function

- relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(5):1932-6.
213. Kesavan P, Wang L, Davis E, Cuesta A, Sweet I, Niswender K, et al. Structural instability of mutant beta-cell glucokinase: implications for the molecular pathogenesis of maturity-onset diabetes of the young (type-2). *The Biochemical journal*. 1997;322 (Pt 1):57-63.
214. Amed S, Oram R. Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): Making the Right Diagnosis to Optimize Treatment. *Canadian journal of diabetes*. 2016;40(5):449-54.
215. Raimondo A, Chakera AJ, Thomsen SK, Colclough K, Barrett A, De Franco E, et al. Phenotypic severity of homozygous GCK mutations causing neonatal or childhood-onset diabetes is primarily mediated through effects on protein stability. *Human molecular genetics*. 2014;23(24):6432-40.
216. Beer NL, van de Bunt M, Colclough K, Lukacs C, Arundel P, Chik CL, et al. Discovery of a novel site regulating glucokinase activity following characterization of a new mutation causing hyperinsulinemic hypoglycemia in humans. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(21):19118-26.
217. Heredia VV, Thomson J, Nettleton D, Sun S. Glucose-induced conformational changes in glucokinase mediate allosteric regulation: transient kinetic analysis. *Biochemistry*. 2006;45(24):7553-62.
218. Sayed S, Langdon DR, Odili S, Chen P, Buettger C, Schiffman AB, et al. Extremes of clinical and enzymatic phenotypes in children with hyperinsulinism caused by glucokinase activating mutations. *Diabetes*. 2009;58(6):1419-27.
219. Zelent B, Odili S, Buettger C, Shiota C, Grimsby J, Taub R, et al. Sugar binding to recombinant wild-type and mutant glucokinase monitored by kinetic measurement and tryptophan fluorescence. *The Biochemical journal*. 2008;413(2):269-80.
220. Zelent B, Raimondo A, Barrett A, Buettger CW, Chen P, Gloyn AL, et al. Analysis of the co-operative interaction between the allosterically regulated proteins GK and GKRP using tryptophan fluorescence. *The Biochemical journal*. 2014;459(3):551-64.
221. Christesen HB, Tribble ND, Molven A, Siddiqui J, Sandal T, Brusgaard K, et al. Activating glucokinase (GCK) mutations as a cause of medically responsive congenital hyperinsulinism: prevalence in children and characterisation of a novel GCK mutation. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2008;159(1):27-34.
222. Molnes J, Bjorkhaug L, Sovik O, Njolstad PR, Flatmark T. Catalytic activation of human glucokinase by substrate binding: residue contacts involved in the binding of D-glucose to the super-open form and conformational transitions. *The FEBS journal*. 2008;275(10):2467-81.
223. Pal P, Miller BG. Activating mutations in the human glucokinase gene revealed by genetic selection. *Biochemistry*. 2009;48(5):814-6.
224. Gloyn AL, Odili S, Buettger C, Njolstad PR, Shiota C, Magnuson M, et al. Glucokinase and the regulation of blood sugar: a mathematical model predicts the threshold for glucose stimulated insulin release for GCK gene mutations that cause hyper- and hypoglycaemia. In: Magnuson M, Matschinsky F, editors.

Glucokinase and glycemie diseases: from the basics to novel therapeutics. Basel: Karger; 2004. p. 92-109.

225. Marotta DE, Anand GR, Anderson TA, Miller SP, Okar DA, Levitt DG, et al. Identification and characterization of the ATP-binding site in human pancreatic glucokinase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2005;436(1):23-31.

226. Larion M, Salinas RK, Bruschweiler-Li L, Miller BG, Bruschweiler R. Order-disorder transitions govern kinetic cooperativity and allostery of monomeric human glucokinase. *PLoS biology*. 2012;10(12):e1001452.

227. Tiedge M, Richter T, Lenzen S. Importance of cysteine residues for the stability and catalytic activity of human pancreatic beta cell glucokinase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000;375(2):251-60.

228. Veiga-da-Cunha M, Courtois S, Michel A, Gosselain E, Van Schaftingen E. Amino acid conservation in animal glucokinases. Identification of residues implicated in the interaction with the regulatory protein. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(11):6292-7.

229. van Schaftingen E, Veiga-da-Cunha M, Niculescu L. The regulatory protein of glucokinase. *Biochemical Society transactions*. 1997;25(1):136-40.

230. Vandercammen A, Van Schaftingen E. Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase. *The Biochemical journal*. 1993;294 (Pt 2):551-6.

231. Veiga-da-Cunha M, Xu LZ, Lee YH, Marotta D, Pilkis SJ, Van Schaftingen E. Effect of mutations on the sensitivity of human beta-cell glucokinase to liver regulatory protein. *Diabetologia*. 1996;39(10):1173-9.

232. Casey AK, Miller BG. Kinetic Basis of Carbohydrate-Mediated Inhibition of Human Glucokinase by the Glucokinase Regulatory Protein. *Biochemistry*. 2016;55(21):2899-902.

233. Toyoda Y, Miwa I, Satake S, Anai M, Oka Y. Nuclear location of the regulatory protein of glucokinase in rat liver and translocation of the regulator to the cytoplasm in response to high glucose. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;215(2):467-73.

234. Henderson BR, Eleftheriou A. A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Experimental cell research*. 2000;256(1):213-24.

235. Kakisaka M, Mano T, Aida Y. A high-throughput screening system targeting the nuclear export pathway via the third nuclear export signal of influenza A virus nucleoprotein. *Virus research*. 2016;217:23-31.

236. Guttler T, Madl T, Neumann P, Deichsel D, Corsini L, Monecke T, et al. NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1. *Nature structural & molecular biology*. 2010;17(11):1367-76.

237. Xu D, Farmer A, Collett G, Grishin NV, Chook YM. Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database. *Molecular biology of the cell*. 2012;23(18):3677-93.

238. la Cour T, Kiemer L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 2004;17(6):527-36.
239. Zheng Z, Li A, Holmes BB, Marasa JC, Diamond MI. An N-terminal nuclear export signal regulates trafficking and aggregation of Huntingtin (Htt) protein exon 1. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(9):6063-71.
240. Fu SC, Imai K, Horton P. Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESsential. *Nucleic acids research*. 2011;39(16):e111.
241. Engelsma D, Bernad R, Calafat J, Fornerod M. Supraphysiological nuclear export signals bind CRM1 independently of RanGTP and arrest at Nup358. *The EMBO journal*. 2004;23(18):3643-52.
242. Engelsma D, Valle N, Fish A, Salome N, Almendral JM, Fornerod M. A supraphysiological nuclear export signal is required for parvovirus nuclear export. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(6):2544-52.